INRS - Institut Armand-Frappier

Étude approfondie des systèmes de communication intercellulaire chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Par Valérie Dekimpe

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne Examinateur externe Examinatrice externe Directeur de recherche

Droits réservés de Valérie Dekimpe, 2010

Prof. Charles Dozois, INRS-IAF

Prof. Roger Levesque, Université Laval

Prof. Sylvie Chevalier, Université de Rouen

Prof. Éric Déziel, INRS-IAF

Résumé

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928, les antibiotiques sont devenus le traitement antibactérien le plus efficace dans la lutte contre les infections bactériennes. Toutefois, la découverte de chaque nouvel antibiotique s'est toujours soldée par l'apparition d'un phénomène de résistance à celui-ci, dû à l'impressionnante adaptabilité bactérienne (Clatworthy et al., 2007).

Les antibiotiques tuent ou inhibent la croissance des bactéries en ciblant des composants propres aux procaryotes tels que la paroi bactérienne, la réplication de l'ADN ou la synthèse ribosomale. Ce mécanisme d'action génère une pression sélective favorisant la survie de bactéries résistantes. Idéalement, les futurs traitements antibactériens devraient limiter le phénomène de pression sélective. Dans ce but, cibler non pas la croissance bactérienne mais plutôt l'expression de la virulence ou l'interaction hôte-pathogène devient une avenue plus prometteuse. Ainsi, la diminution de l'effet pathogène des bactéries permettrait au système immunitaire de les éliminer efficacement et sans dommage pour l'hôte.

Les systèmes de communication intercellulaire permettent aux bactéries de se synchroniser dans l'expression de nombreux facteurs en fonction de leur densité de population. Ceux-ci font donc partie des cibles les plus intéressantes pour lutter contre les pathogènes bactériens, puisqu'ils régulent généralement l'expression de leur virulence sans affecter leur croissance. Il est donc fondamental de cerner précisément le fonctionnement de ces systèmes de communication afin d'élaborer des stratégies fines pour les inhiber efficacement.

La présente thèse porte sur l'étude approfondie des trois systèmes de communication intercellulaire chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Dans le premier chapitre, les systèmes Las et Rhl seront présentés, ainsi que les contributions personnelles que j'ai apportées pour une meilleure compréhension de leur interaction. Les deux autres chapitres portent sur le troisième système de communication découvert chez *P. aeruginosa*, et appelé MvfR-PQS. Dans un premier temps, j'apporte des précisions importantes sur les voies de biosynthèse des molécules-signal, appelées les 4-hydroxy-2-

alkylquinolines ou HAQ, impliquées dans ce nouveau système. Dans un second temps, je résume les connaissances apportées sur l'étude d'une protéine, nommée PqsE, jouant un rôle fondamental dans l'expression des facteurs de virulence contrôlés par ce système.

Étudiant

Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté de consacrer une importante partie de leur temps à lire ce document. Merci à la Dre Sylvie Chevalier, pour avoir accepté de traverser un océan pour évaluer la présentation de cette thèse. Merci également aux Prof. Charles Dozois et Roger Levesque pour leur temps, leurs commentaires, leur implication et leur soutien tout au long des étapes d'avancement de ce long projet. Leurs conseils avisés lors des différentes rencontres m'ont permis de réorienter plus adéquatement mes recherches et d'apporter des améliorations à la qualité des travaux présentés ici.

Je remercie la Fondation Armand-Frappier ainsi que le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies pour leur soutien financier durant mes cinq

années de recherche.

Je tiens à remercier également le Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement. L'esprit de cohésion, de collaboration qui règne entre les différents professeurs et étudiants est une belle illustration de ce qu'est l'effort d'équipe. Les travaux présentés n'auraient d'ailleurs probablement pu aboutir sans la collaboration inestimable du laboratoire de spectrométrie de masse. Merci donc à Sylvain Milot pour son esprit de débrouillardise hors pair, ses nombreuses explications, pour son aide sur le plan technique ainsi que pour les sucreries, le tout offert généreusement tout au long des années de ma thèse. Merci au Prof. François Lépine pour son temps, son expertise, mais également son agréable compagnie en congrès, ainsi que la disponibilité dont il a toujours fait preuve à mon égard. Merci également à la Prof. France Daigle pour son aide dans la mise au point de la technique du SCOTS.

J'adresse une profonde reconnaissance aux membres du laboratoire du Prof. Éric Déziel, passés et présents. Merci aux Juliens, à Geneviève, Martin, Julie, Danielle, Jean-Philippe, Sandra, Josée, Ludovic, Anne-Pascale, qui m'ont tous appuyée dans mes recherches, qui ont rendu la vie de labo agréable et stimulante, et avec qui les moments de détente étaient partagés dans la bonne humeur. Merci à tous ceux également qui m'ont dépannée pour l'une ou l'autre expérience au cours de ces cinq années, et plus particulièrement celle de 2009, durant laquelle il m'a fallu compter davantage sur leur aide. Merci aussi à Julien pour son aide en bioinformatique, à la stagiaire Natacha Laprade pour l'énorme criblage réalisé dans le cadre de mon projet et à Martin pour les expériences qu'il a terminées pour moi en toute fin de thèse. Je n'aurais pu mener à terme cette thèse sans leur aide précieuse. Toute ma reconnaissance s'adresse également aux agentes de recherche passée et présente, Émilie Gauthier et Marie-Christine Groleau, qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail. Leur amitié est une valeur inestimable que je compte préserver le plus longtemps possible.

Je ne saurais jamais remercier assez mon directeur de recherche, le Prof. Éric Déziel, pour... tout. Son soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme. Sa passion contagieuse, ses compétences scientifiques et ses grandes qualités humaines ont fait de mon passage dans son laboratoire une expérience de vie inoubliable qu'il sera difficile de retrouver ailleurs. Je tiens à le remercier encore pour la confiance, la

sympathie et le support qu'il m'a témoignés dès mon arrivée ici au Québec. Sans son aide, mon séjour aurait été sans conteste fortement raccourci.

Je tiens enfin à adresser mes remerciements à ma famille et mes amis du plat pays qui, malgré l'océan qui nous sépare, m'ont toujours soutenue tout au long de ces années. Ma reconnaissance est profonde envers mes parents, qui m'ont offert l'éducation, l'épanouissement, ainsi que les soins affectifs et matériels nécessaires pour me permettre de développer mes aptitudes et d'en faire bénéficier ceux qui m'entourent. Cette thèse est le fruit de tous les efforts qu'ils ont consacrés pour moi. Mon désir est d'un jour en offrir autant à mes propres enfants.

Les derniers remerciements seront pour Tanguy, pour son soutien moral dans les moments plus creux, pour sa patience, son écoute et pour la confiance qu'il a toujours

eue en mes capacités.

Ultimement, un grand merci au Petit Clément, qui a pourtant « volé » tant de temps à cette thèse, mais dont l'existence m'enchante depuis plus d'un an maintenant.

Liste des tableaux

Table 1-1. Bacterial strains and plasmids used in this study.	13
l'ableau 2-1. Liste et caractéristiques des mutants présentant un phénotype non-iridescent	27
Tableau 2-2. Liste des mutants non-iridescents identifiés lors du criblage en milieu acide	01
Tableau 2-3. Liste des mutants non-iridescents produisant encore des HAQ	.71
Tableau 3-1. Liste des régulateurs influençant la production de pyocyanine chez P. aeruginosa1	.74 1.73
l'ableau 3-2. Identification des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif dans différentes	
etudes et comparaison avec les gènes affectés dans un mutant pas E	64
1 ableau 3-3. Liste des molécules utilisées dans ce chapitre	85
l ableau 3-4. I ableau des composantes favorisant ou défavorisant la respiration cellulaire des	
souches PA14, pqsE, rhlR et phzCIC2 l'une par rapport à l'autre, par PM2) 2 2
Tableau 3-5. Liste des protéines produites seulement chez le mutant pqsE.	122
Tableau 3-6. Liste des protéines produites seulement chez le mutant phzM2	123
Tableau 3-7. Détection de la radioactivité des différentes fractions de la souche sauvage PA14 et du mutant pqsE.	1
Tableau 3-8. Détection des molécules VD279, VD295 et VD323 dans vingt-neuf analyses LC-MS2	34
Tableau 3-9. Liste des régions intergéniques s'hybridant avec l'ARNm de <i>rhlR</i> 2	40
Tableau 3-10. Analyse des régions intergéniques identifiées par le SCOTS et recherche de région orthologue chez la souche PAO1	
Tableau 3-11. Liste des sous-groupes appartenant à la superfamille des métallo-6-lactamases	
(Bebrone, 2007; Daiyasu <i>et al.</i> , 2001) et leurs caractéristiques connues semblables ou différent	tes
de PqsE	06
Tableau 3-12. Liste des caractéristiques du substrat de PqsE3	23

Liste des figures

Figure 1-1. Schéma représentant le système de quorum sensing basé sur les AHL chez la bactérie P.
Figure 1-2. Expression of pyocyanin is delayed in a large and the same of the
Figure 1-3. The delay in processing expression in a lask mutant
Figure 1-3. The delay in pyocyanin expression in a lask mutant is not due to secondary mutation or
to a difference in the concentration of living cells
Figure 1-4. Expression of RhIR-controlled factors is delayed in a lask mutant
Figure 1-6. Protease activity is expressed by a last mutants increases during late stationary phase
Figure 1-6. Protease activity is expressed by a lask mutant but not by a lask rhlk mutant
Figure 1-7. LasA and LasB are activated late in a lasR mutant but not in a lasR rhlR double mutant.
Figure 1-8. Production of PQS and 3-0x0-C ₁₂ -HSL requires <i>rhlR</i> in absence of <i>lasR</i>
Figure 1-9. The last gene is activated by DhID in a betaneless of lask
Figure 1-9. The last gene is activated by RhIR in a heterologous E. coli system
Figure 1-10. Proposed model for RhlR influence on the <i>las</i> regulon
rh/R
rhlR
Figure 1-13. Analyse LC-MS de la production de molécules-signal en présence (pUCPSKrhlR) ou en
absence de RhiR
absence de RhIR
Figure 2-1. Structure des différentes séries de HAQ présentes chez P. aeruginosa (Lépine et al.,
2004)
Figure 2-2. Voie de biosynthèse du tryptophane (A) et de l'acide anthranilique (B) (Farrow & Pesci,
2007)
Figure 2-3. Arrangement génomique de la région de l'opéron pqsABCDE, de mvfR et de phnAB
(www.pseudomonas.com)
Figure 2-4. Transformation de l'acide anthranilique en anthranoyl-CoA catalysée par l'enzyme PqsA
(Zhang et al., 2008)
Figure 2-5. Schéma hypothétique de la voie de biosynthèse du HHQ et du PQS (Bera et al., 2009)52
Figure 2-6. Production de PQS à partir du HHQ par l'action de PqsH. Adapté de Bera et al. (2009)52
Figure 2.7 Riosynthèse du MONO Admiré la Réchaire de Bera et al. (2009).
Figure 2-7. Biosynthèse du HQNO. Adapté de Déziel et al. (2004)
Figure 2-8. Inhibition de la chaîne respiratoire par le HQNO: blocage du cytochrome bc1
(1 rumpower, 1990a)
riguite 2-9. Formation et composition des microvésicules. Adapté de Kuehn & Kosty (2005)
rigui e 2-10. Comparaison de la region codant pour les enzymes de biosynthèse des UAO et des
TIMAY Chez P. aeruginosa et B. ambifaria respectivement (Viol et al. 2009)
rigui e 2-11. Nepi escutation schemannile dii nigemide ni N10
Figure 2-12. Schématisation du transposon ISlacZ/hah utilisé pour les mutagenèses aléatoires (Jacobs
ει αι., 2003 h
Figure 2-13. Schématisation de l'amplification de la région d'insertion du transposon (schéma de
Juich Templay)
rigure 2-14. Cinetique de production des métabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de l'opéron nge ARCDE abox De compine de 1700 des metabolites de 1700 des m
Figure 2-15. Croissance bactérienne (symbole blanc) et production des HAQ (symboles noirs) en
mineu anaerodie chez P. aeruginosa PA14
rigure 2-10. Production de pyocyanine (A) et de POS (B) en présence de 4-CARA (1.5 mM) et 6
FADA (3 IIIVI) chez la souche PA14 cultivée en TSB pendant 9h à 37°C
riguit 2-1/1 Toutition de dyocyanine en présence 1 mM de 4-CARA dons un mutant que 4-
polaire complemente avec 10 mg/l de POS
1 guit 2-10. I roduction de nav et de DHO en presence de la 7-bromo-N-(3 fluoronbémit) anétamit à
(molécule B) dans PA14.
003

Figure 2-19. Illustration des sites d'insertion transpositionnelle dans la région mvfR-phnAB- pgsABCDE
pqsABCDE.
Figure 2-20. Production de HAQ chez la souche sauvage en milieu neutre et acide
Figure 2-21. Localisation des insertions transpositionnelles dans la région mvfR-phnAB-pqsABCDE
lors du criblage en milieu acide92 Figure 2-22. Production de HHQ, de HQNO et de DHQ dans différents mutants de l'opéron
pqsABCDE97
Figure 2-23. Production de HHQ et DHQ dans différents mutants de l'opéron cultivés seuls ou en co-
culture, et en présence de 20 mg/l de PQS99
Figure 2-24. Production de HHQ chez les mutants pqs en présence de différents surnageants100
Figure 2-25. Schéma résumant les conditions utilisées pour la production et la détection du
précurseur du HHQ101
Figure 2-26. Production de HHQ en présence des inhibiteurs B ou M27, dans un mutant pqsA np pqsH102
Figure 2-27. Production de HHQ dans un mutant pqsA np pqsH exposée à la fraction polaire ou non
polaire d'un surnageant de $pqsC_{np}$ 103
Figure 2-28. Production de HHQ deutéré dans un mutant pqsA np pqsH en présence du surnageant
d'un mutant pqsC _{np} nourri à l'acide anthranilique deutéré ou non104
Figure 2-29. Structure d'un analogue du HHQ contenant un ester méthylique105
Figure 2-30. Production de HHQ par pqsA np pqsH en présence de différentes fractions du
surnageant de pqsC non polaire105
Figure 2-31. Production de HHQ par le mutant pqsA np pqsH en présence de différentes fractions
HPLC106
Figure 2-32. Production de HHQ par le mutant pqsA no pqsH en présence de la fraction 5-10 min. du
surnageant de pqsC np contenant les molécules de masse supérieure (rétentat) ou inférieure
(filtrat) à 3000 Da108
Figure 2-33. Réaction de l'hydrazine (NH ₂ H ₂) avec les liens ester ou thiolester109
Figure 2-34. Production de HHQ in vitro.
Figure 2-35. Production de HAQ dans un mutant $pqsL$ en fin de phase stationnaire (DO ₆₀₀ = 7)112
Figure 2-36. Production de HQNO dans différents mutants de l'opéron pqs en présence de différents
surnageants115
Figure 2-37. Production de HQNO dans différents mutants exposés ou non au surnageant des
mutants pqsA et pqsL116
Figure 2-38. Schéma hypothétique de la biosynthèse du HQNO117
Figure 2-39. Production de HQNO chez les mutants pqsA np et pqsC np en présence de surnageant du
mutant pqsL
Figure 2-40. Production de HQNO par le mutant pqsA exposé au surnageant d'un mutant pqsL pris
à différents temps de croissance
Figure 2-41. Caractérisation pHQNO1
Figure 2-42. Chromatogrammes de la production de HQNO et de HHQ chez le mutant $pqsA_{np}$ $pqsH$ en présence de l'extrait à l'acétone en condition acide du surnageant de $pqsC_{np}$ 122
Figure 2-43. Phénotype d'iridescence et d'autolyse sur milieu solide chez différents mutants après 48
heures d'incubation à 37°C124
Figure 2-44. Analyse du phénotype sur colonie (A) et de la production des HAQ (B) dans un mutant
lasR surexprimant pqsL (pVD08) ou rhlR (pUCPSKrhlR)127
Figure 2-45. Suivi de la stabilité du nitro-HQNO dans une culture de <i>P. aeruginosa</i> PA14129
Figure 2-46. Élimination de l'iridescence en présence de H ₂ O ₂ 130
Figure 2-47. Schéma proposé de biosynthèse du HHQ et du HQNO chez <i>P. aeruginosa</i> 143
Figure 2-48. Schéma des intermédiaires de biosynthèse du DHQ (Bera et al., 2009)147
Figure 2-49. Schémas hypothétiques de biosynthèse du HHQ à partir de l'anthranoïl-PqsD (Bera et
al., 2009)
Figure 2-50. Schéma du système double-hybride proposé pour étudier l'interaction entre PqsB et
PqsC (Dove & Hochschild, 2004)152
Figure 3-1. Biosynthèse des phénazines chez P. aeruginosa. Adapté de Mavrodi et al. (2001)
Figure 3-2. Métabolisme de l'oxygène et production de ROS (espèces réactives d'oxygène). Adapté de
Chabot et al. (1998)

Figure 3-3. Représentation de la plupart des facteurs influençant le quorum sensing chez P.	
Figure 3-4. Structure de trois di-kéto-pipérazines produites par <i>P. aeruginosa</i> (Holden <i>et al.</i> , 1	999).
Jafra, 2009)	ki &
et al., 2001)	esnik
Figure 3-7. Mecanisme de régulation par les ARN non codants sur les ARNm (Storz et al. 200)	4) 17
Figure 3-8. Mécanismes de régulation des ARNnc sur les protéines (Waters & Storz, 2009) Figure 3-9. Rôle des ARNnc dans le QS chez (A) V. harvevi et (B) V. cholerge (Bejerano-Sagie	18
Xavier, 2007)	ecords
Figure 3-11. Schématisation globale de la méthode SCOTS.	183
Figure 3-12. Alignement protéine-protéine de la séquence de PqsE par BLAST protéine-protéi (blastp) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).	
Figure 3-13. Alignement de séquences entre PqsE et les gènes retrouvés dans les espèces Burkh	205
ayant le plus d'homologie avec PqsE (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)	olderia
Figure 3-14. Production de pyocyanine en présence de 3 mM captopril dans PA14.	207
Figure 3-15. Alignement de séquence des domaines conservés de PqsE et d'une métallo-beta-	208
lactamase impliquée dans le métabolisme de l'ARN (http://blocks.fhcrc.org/)	
Figure 3-16. Production de pyocyanine dans une co-culture des mutants phzCI C2 et pqsE	210
Figure 3-17. Test de résistance au stress oxydatif chez PA14 et chez le mutant pqsE	212
Figure 3-18. Suivi de la transcription de plusieurs rapporteurs transcriptionnels dans PA14 et	214
le mutant pqsE avec ou sans ajout de pyocyanine (20 mg/l) ou de paraquat (100 mM)	chez
Figure 3-19. Transcription des gènes (A) mexG-lacZ (pED1) et (B) hcnA-lacZ (pME3826) dans	215
double mutant phzCI'CZ'	le
Figure 3-20. Activation du rapporteur transcriptionnel mexG-lacZ (pED1) en présence de diffé	216
inducteurs de stress oxydatif. L'échantillonnage a eu lieu à une DO ₆₀₀ = 4	rents
Figure 3-21. Transcription de <i>rhlA-lacZ</i> (pECP60) (graphique de gauche) et de <i>rhlI-lacZ</i> (pMW	218
(graphique de droite) dans PA14, pqsE et rhlR	(305)
Figure 3-22. Croissance bactérienne en présence de 5-FOA	220
Figure 3-23. Comparaison des protéomes de pqsE et phzM par gels bidimensionnels, fraction	223
intracellulaire.	225
rigure 3-24. Production de di-kéto-ninérazines nar différentes souches	220
Figure 3-25. Détection des molécules non polaires extracellulaires chez PA14 et chez le mutant	228
par phosphorimager.	oqse 220
Figure 3-26. Visualisation aux UV (254 nm) de la 3ème et 4ème séparation chromatographique	230
isoler la molécule V dans PA14.	pour
Figure 3-27. Profil de fragmentation de la molécule V par LC-MS-MS	231
Figure 3-28. Analyse chromatographique et spectrométrique de la molécule V.	222
Figure 3-29. Analyse du surnageant des cultures de PA14 et du mutant pqsE : cinétique de	233
production des HAQ.	225
Figure 3-30. Production de DHQ (A) chez le mutant pqsE et chez la souche sauvage	220
Figure 3-31. Chromatogramme de la molécule VD279 dans PA14 et chez le mutant pqsE	238
Figure 3-32. Chromatogramme de la molécule VD295 dans PA14 et chez le mutant pqsE	241
Figure 3-33. Spectres de masse des molécules VD279 et VD295 produites en présence d'acide anthranilique tétradeutéré.	
Figure 3-34. Profil de fragmentation par LC-MS-MS de la molécule VD279, simplement (283) et	243
doublement (283) marquée	[
Figure 3-35. Profil de fragmentation par LC-MS-MS de la molécule 295, simplement (299) et	244
doublement (303) marquée.	
Figure 3-36. Détection par LC-MS de plusieurs produits de l'opéron pqsABCDE en présence de	245
l'inhibiteur B chez le mutant pqsE	
	246

Figure 3-37. Marquage de VD279: Analyse LC-MS du surnageant du mutant pqsE exposé à 50 mg/l
de tryptophane pentadeutéré247
Figure 3-38. Cinétique de production par LC-MS de VD279 dans le surnageant du mutant pqsE248
Figure 3-39. Quantification de la production de VD279 par LC-MS dans différentes conditions
expérimentales249
Figure 3-40. Analyse LC-MS de la production de VD279 par le mutant pqsE pLG12 (pqsABCD) avec
ajout de 200 mg / l d'acide anthranilique dans différents milieux de culture250
Figure 3-41. Structures hypothétiques du VD279251
Figure 3-42. Analyse de la dégradation du VD279 marqué (m/z+1 = 283) dans différentes souches de
P. aeruginosa PA14 (A) et d'E. coli JM109 (B) exprimant ou non le gène pqsE252
Figure 3-43. Détection par LC-MS de la dégradation du VD279 en présence de pyocyanine dans un
milieu abiotique253
Figure 3-44. Analyse LC-MS de la production des HAQ chez la souche sauvage PA14 (A) et
transcription de l'opéron pqsABCDE (pGX5) (B) en présence de plusieurs concentrations de
VD279 dans PA14 et dans pqsE255
Figure 3-45. Analyse de la transcription de pqsA-lacZ (pGX5) dans un mutant pqsA en présence de
Figure 3-45. Analyse de la transcription de pqsA-uc2 (pGA5) dans un indiant pqsA en presence de
10 mg/l de VD279 ou de PQS
Figure 3-46. Activité beta-galactosidase du rapporteur pqsA-lacZ (pGX5) chez la souche sauvage et
les mutants pqsE et rhlR257
Figure 3-47. Quantification par LC-MS de la production (A) d'acide anthranilique et des (B, C, D)
HAQ chez le mutant pqsE par rapport à la souche sauvage en présence ou non de 50 mg/l
d'acide anthranilique (AA)258
Figure 3-48. Analyse de la transcription de pqsA et mvfR en présence ou non de la séquence de
reconnaissance lux dans leur région promotrice260
Figure 3-49. Analyse LC-MS de la production de DHQ chez la souche sauvage, pqsE et rhlR à DO600
de 6
Figure 3-50. Transcription de pqsA-lacZ (A) et quantification LC-MS des HAQ (B) dans PA14
surexprimant ou non pqsE262
Figure 3-51. Production de pyocyanine chez des mutants complémentés par pqsE263
Figure 3-52. Mécanisme d'hydrolyse du cycle aromatique des AHL
Figure 3-53. Bio-essai : Détection des AHL chez PA14 et pqsE par C. violaceum CV026265
Figure 3-53. Détection LC-MS de la dégradation des AHL en présence de PqsE267
Figure 3-55. Analyse par LC-MS de la cinétique de production et de dégradation des AHL
principaux de <i>P. aeruginosa</i> dans PA14 et son mutant pqsE268
Figure 3-56. Quantification de la production de pyocyanine par un mutant <i>lasR</i> exprimant
rigure 3-56. Quantification de la production de pyocyanine par un initiant usa exprimant
constitutivement pqsE et /ou rhlR durant (A) toute la croissance bactérienne et (B) durant le
début de la phase exponentielle270
Figure 3-57. Quantification de la pyocyanine en présence de 3 mM de 6-FABA dans différentes
souches272
Figure 3-58. (A) Quantification de la production de pyocyanine par spectrophotométrie dans un
double mutant lasR pqsE (pUCPSKrhlR). (B) Amplification PCR du gène pqsE273
Figure 3-59. Production de pyocyanine lors d'une surexpression de (A) rhlR ou de (B) pqsE dans
différentes souches après 9 heures de culture274
Figure 3-60. Analyse par spectrophotométrie de la pyocyanine chez les mutants las R et las R pas E 275
Figure 3-61. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine en présence de pqsE et
/ou de 5 mg/l de C ₄ -HSL
Figure 3-62. Production de pyocyanine dans PA14 en présence de pqsE et/ou de 5 mg/l de C ₄ -HSL.
277
Figure 3-63. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine chez les mutants qscR,
à une DO ₆₀₀ = 5278
Figure 3-64. Étude de <i>rsaL.</i>
Figure 3-65. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine dans plusieurs souches
exprimant constitutivement <i>rhlR</i> (pUCPSK <i>rhlR</i>), en milieu TSB281
Figure 3-66. Analyse LC-MS de la production de (HHQ+PQS) dans différents mutants exprimant ou
rigure 3-66. Analyse LC-MS de la production de (HHQ+PQS) dans differents indiants exprimant ou non $pqsE$ (pDN19 $pqsE$) (DO ₆₀₀ =5)283
non <i>pase</i> (DDN19 <i>pase</i>) (DO ₆₀₀ =5)203

.284
.284 R^,
285
287
287 289
204
291 294
294 295
295
295 297
i
300
299 m
300
300 311
311

Liste des abréviations

Symbole	Abréviations
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
μ	Micro
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
0,5X	Une demi fois
1X	Une fois
2X	Deux fois
3-oxo-C ₁₂ -	
HSL	N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone
4-CABA	Acide 4-chloro-2-amino-benzoïque
5X	Cinq fois
6-FABA	Acide-6-fluoro-2-amino-benzoïque
ACP	Acyl-carrier-protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHL	N-acyl-homosérine lactone
Ala	Alanine
ARN	Acide ribonucléique
ARNnc	Acide ribonucléique non codant
C ₄ -HSL	N-butyryl homosérine lactone
CoA	Coenzyme A
C-terminal	Carboxy-terminal
0000	Disodium 3-(4-methoxyspiro {I,2-dioxetane-3,2'-(5'-
CSPD	chloro)tricyclo[3.3.1.13,7]decan}-4-yl) phénylphosphate
Da	Dalton
DAP	Acide di-amino pimélique
DHQ	2,4,-Di-HydroxyQuinoline
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
- е	Fer
7	Unité d'accélération valant environ 9,81 m/s2
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinoline
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
	High performance liquid chromatography – mass spectrometer
HPLC-MS	Specife de masse couple a un appareil de chromatographie on phone liquida l
11 EO-1013	haute performance
IQNO	4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxyde
ISL	Homosérine lactone
-Phe	Phénylalanine lévogyre
-Val	Valine lévogyre
1	Molaire
	MOIGHO

m/z	Masse sur charge
	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
	Spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une
MALDI-TOF	matrice et un analyseur à temps de vol
mg	Milligramme
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
NBT/BCIP	Solution de substrat de la phosphatase alcaline : nitroblue tétrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
nm	Nanomètre
N-terminal	Amino-terminal
pb	Paires de bases
ppm	Parties par million. Dans ce cas-ci, milligrammes par litre.
PQS	Pseudomonas quinolone signal, 3,4-dihydroxy-2-alkylquinoline
Pro	Proline
QS	Quorum sensing
rpm	Rotations par minute
SCOTS	Capture sélective des séquences transcrites
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSPE	Saline Sodium Phosphate EDTA
	Thin Layer Chromatography
TLC	Chromatographie en couche mince
Tyr	Tyrosine
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
Δ	Delta
λ	Lambda
σ	Sigma
Y	Chi

Table des matières

RÉSUMÉ	
REMERCIEMENTS	
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V11
MISE EN CONTEXTE	XIII
1 HIÉRARCHIE DES SYSTÈMES DE QUORUM SENSING CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA	
1.1 INTRODUCTION	3
2001 uni sensing» chez P. aeruginosa	
-) otomos do "quorum sensinu» chez e aemonosa	
o sjocij da projet	-
1.2 ARTICLE	8
1.2.1 Résumé - Summary	8
	_
	1041
- Totalo and protease enzymatic assays	
**	
The expression of Milk-leuthaleu factors is only delayed in chooses at least	
1.2.4.3 RhIR controls last in a heterologous system	24
1.2.5 Discussion	25
1.2.5.1 RhIR-regulated factors are expressed late in a lasR mutant	
"" Fartially Controls East Specific Ideitors in ansence of a functional Load as	1 - 1 -
Lusiv is a unfect and morrest requision of OS-controlled games	September 1
The transfer of distribution and the state of the state o	_
TRESOLUTION ANNUALS ALL ARTICLE	•
contains genes dependents de Lask ne sont tamais activée nas DhID	
confirmation des resultais obienus avec la souche PA14 dans plusieurs autres souches	
	32
= 9500 Me Trinit Sur les civies de Lust n'est nas visible lorgane ce demain ant mil	35
and the state of t	36
1.3.4.1 Description de la méthode de retard de mobilité sur gel d'électrophorèse (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay)	
1.4 CONCLUSION DU CHAPITRE	38
	38

-HYDROXY-2-ALK	DE <i>QUORUM SENSING</i> PQS-MVFR : BIOSYNTHÈSE ET FONCTION YLQUINOLINES	41
	rion	
2.1 INTRODUCT	erte du système MvfR-PQS	41
2.1.1 Découve	me MvfR-PQS est un nouveau système de quorum sensing chez P. aeruginosa .	12
2.1.2 Le systè	me MvJR-PQS est un nouveau systeme de quot un sensing chez 1 . det ugmosd . n pqsABCDE est responsable de la production de nombreuses molécules	11
2.1.3 L'opéro	n pasabode est responsable de la production de hombreises indicedes opéron pasABCDE est nécessaire pour la production des 4-hydroxy-2-alkylquin	nolines
2.1.3.1 L'	operon pqsAbCoE est necessaire pour la production des 4-nydroxy-2-aixyrquin	44
(HAQ) 2.1.3.2 L'o	opéron pgsABCDE produit également du 2,4-dihydroxyquinoline	45
2.1.4 Voie de	biosynthèse des HAQbiosynthèse des HAQ	45
2.1.4 Voie de 2.1.4.1 Le	es HAQ sont issus de la condensation de l'acide anthranilique avec une chaîne	
alinhatique sy	unthétisée elle-même à partir d'acétate	45
2.1.4.2 Ca	aractéristiques des gènes intervenant dans la biosynthèse des HAQ	45
2,1,4,2,1	La production d'acide anthranilique dépend de nombreux gènes	45
2.1.4.2.1	.1 Les gènes trpE et trpG codent une anthranilate synthase impliquée dans la biosynt	thèse
du trypto	phane	47
2.1.4.2.1	.2 Les gènes phnA et phnB codent une anthranilate synthase	47
2.1.4.2.1	.3 Les gènes kynA, kynB et kynU codent des enzymes impliquées dans la dégradation	1 du 40
	ane en acide anthranilique	40
2.1.4.2.1	PqsA, PqsB, PqsC et PqsD transforment l'acide anthranilique en HAQ	49
2.1.4.2.2 2.1.4.2.2		49
2.1.4.2.2		50
2.1.4.2.2		acyl-
carrier		51
2.1.4.2.3	PosH transforme le HHO en POS	52
2.1.4.2.4	PqsL est impliqué dans la biosynthèse du HQNO	52
2.1.4.2.5	MvfR régule la transcription de l'opéron pqsABCDE	53
2.1.5 Les HA	Q ont de nombreuses fonctions biologiques	55
	es 4-hydroxyquinolines ont des propriétés antibactériennes	55
2.1.5.1.1	4-hydroxyquinolines synthétiques et naturelles	55
2.1.5.1.2	Les HAQ N-oxydes innioent la respiration bacterienne chez plusieurs especes Le HQNO peut protéger certaines bactéries contre des antibiotiques	57
2.1.5.1.3 2.1.5.1.4	Les HAQ N-oxydes protègent P. aeruginosa du phénotype d'autolyse et iridescence	58
	es HAQ sont des molécules-signal	58
2.1.5.3 Le	es HAQ sont impliqués dans la virulence de P. aeruginosa	59
2154 /	e POS est impliqué dans la formation des microvésicules	59
2.1.5.5 Le	e PQS intervient dans la balance d'oxydo-réduction	60
2.1.5.6 Lo	e PQS a un effet chélateur	61
2.1.6 Les HA	Q sont produits par plusieurs genres bactériens	62
2.1.6.1 P	Plusieurs espèces de Burkholderia produisent des HAQ méthylés, les HMAQ	63
2.1.7 Objecti	fs du projet	03
2.1.7.1	Objectifs spécifiques au chapitre Néthodologie et approche globale	65
2.1.7.2 <i>M</i>	, ET MÉTHODES	66
2.2 MATÉRIEL	s, plasmides et conditions de culture	66
2.2.1 Souche. 2.2.1.1 C	s, plasmiaes et conditions de culture	66
2.2.1.1	Construction du plasmide pVD08	68
	tion et concentration des HAQ	
2.2.2.1 E	Extraction à l'acétate d'éthyle	69
2.2.2.2 E	xtraction à l'acétone	69
2.2.3 Purifice	ation par fractionnement au HPLC	70
2.2.4 Sépara	tion des molécules de taille inférieure à 3000 daltons	70
2.2.5 Hvdrol	yse du précurseur extracellulaire polaire des HAQ	70
2.2.6 Produc	ction de HHQ in vitro	71
2.2.7 Analyse	es par spectrométrie de masse	71
2.2.8 Détecti	ion des HAQ par fluorescence	71
2.2.9 Quanti	fication de la pyocyanine	72
	roenèse aléatoire	72

2.2.11 Localisation de l'insertion du transposon par séquençage	
2.2.12 Extraction du transposon après mutagenèse	73
2.2.13 Lyse cellulaire par sonication.	74
2.2.14 Analyse de la formation de biofilms.	75
2.3 RÉSULTATS	75
2.3.1 Cinétique de production des HAO ches D	76
2.3.1 Cinétique de production des HAQ chez P. aeruginosa dans différentes conditions	76
2.3.1.2 Production des HAQ en présence de nitrates	77
2.3.2 Étude des inhibiteurs de la synthèse des HAQ	<i>78</i>
	≀ 80
2.3.2.3 Le 4-CABA n'agit pas seulement en bloquant l'enzyme PqsA	81
2.3.2.4 Inhibiteurs spécifiques des enzymes PqsB et/ou PqsC	82
	83
	84
Diodynanodo da 11110	
Trouble des chaptiles infinitipes time la nicempage du l'intra	
	84
mamberiose dicatolic of chibiage an millen acide	
	93
	95
- The state of the	96
1 do	HHQ
2.3.3.1.2.2 Les enzymes PqsA et PqsD fonctionnent ensemble, les enzymes PqsB et PqsC	
également, dans la biosynthèse du HHQ	
2.3.3.1.2.3 Le pHHO est extracellulaire	98
2.3.3.1.2.3 Le pHHQ est extracellulaire	99
2.3.3.1.3 Identification du pHHQ	99
2.3.3.1.3.1 Le pHHQ est polaire	102
The production of the producti	102
substitute de l'ASD et LASC	101
- Detection an precuisent all HHO	100
= = = = = = = = = = = = = = = = = = =	
The state was chizylines iniplicates trains is procynthese dir HANA	
L opeion pasabobe et le gene past, sont nécessaires à la production de HONO	
1 4371, 1 43D, 1 43C CL FUSI / SOUL HOUSE necessaries now and divise du HONG	
Sequence fonctionnelle des enzymes impliquées dans la biocynthèse du LIONO	114
de i day et i dan et anostrat de bash et basc	
Da proteine i qsc agit en avai de la proteine PosA	116
La proteine i que agit propablement en amont de pasR et pasC	111
- racinitation du substrat de Past	110
Le Diry et l'actue anthrantique coenzyme A ne sont nas le nHONO!	110
2.5.5.2.5.2 Le prignor s'accumule dans le temps	110
2.3.2.3.3 Le precurseur du HUNU) nroduit de Paga et Bago nogràda la	
prodused dd IIIQ	
a diffication particle du substrat de Pasi.	1.73
-1919 Conclusion sur la voie de plosynthese des HACI	122
Livie du lote des metabolites produits par l'opéran pas ADCDE de la livie.	
a duotyse et a tridescence	122
Noic da i ii i i i i i i i i i i i i i i i i	
Oli cacca de fiffo counte a tine attituive mene à l'apposition d'un mi for de la cacca de	
sur colonie sur colonie	•

2.3.4.2 Rôle du HQNO	125
2.3.4.2.1 Lien entre le HQNO et l'apparition d'autolyse et d'iridescence sur milieu solide	125
2.3.4.2.1.1 L'excès de HHQ est nécessaire mais non suffisant pour générer l'autolyse et	
l'iridescence : un autre facteur contrôlé par PqsL intervient	125
2.3.4.2.1.2 Identification du facteur contrôlé par PqsL et impliqué dans l'apparition de l'autoly	se et
de l'iridescencede	127
2.3.4.2.2 Comment le HQNO peut-il « protéger » la bactérie contre l'autolyse ?	128
2.3.4.2.2.1 Le HQNO ne s'associe pas avec le NO pour le détoxifier	128
2.3.4.2.3 D'autres facteurs influencent l'apparition d'iridescence et d'autolyse	129
2.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES DU PROJET	130
2.4.1 Du rôle de l'oxygène dans la production des HAQ	131
2.4.2 Élaboration de nouveaux protocoles de sélection des mutants affectés dans la production	
des HAQ	132
2.4.2.1 Sélection à grande échelle	132
2.4.2.2 Sélection à moyenne et petite échelle	133
2.4.2.2.1 Corrélation entre production de pyocyanine et production de HHQ	133
2.4.2.2.1.1 L'absence de pyocyanine est un bon facteur pour identifier des mutants affectés da	ns
leur production de HHQ	133
2.4.2.2.1.2 Le cas particulier des mutants VD10.41 et pqsL-VD5.79	134
2.4.2.2.2 Corrélation entre fluorescence et production de HHQ	133
2.4.3 PqsA, PqsB, PqsC, PqsD, PqsH et PqsL sont les seules enzymes nécessaires à la biosyn	ıthèse
des HAQ	136
2.4.3.1 Analyse de la biosynthèse des produits de l'opéron pqsABCDE	138
2.4.3.2 L'organisation structurelle de l'opéron pqsABCDE diffère de sa séquence fonction	nelle
	138
2.4.3.3 Plusieurs produits de PqsA et PqsD ont été identifiés	139
2.4.3.3.1 Des produits de l'activité de PqsA et PqsD sont moins polaires que les HAQ	139
2.4.3.3.2 Mise au point des paramètres de détection des produits de PqsA et PqsD	140
2.4.3.3.3 Il existe probablement plus d'un précurseur des HAQ produit de PqsA et PqsD	140
2.4.3.3.4 Le substrat de PqsL est-il un produit de PqsA et PqsD?	141
2.4.3.3.5 Le HQNO et le HHQ ont-ils un intermédiaire commun produit de PqsA et PqsD?	143
2.4.3.3.6 Remise en contexte : activités enzymatiques de PqsA et PqsD dans la biosynthèse des	HAQ
	145
2.4.3.3.6.1 La première étape de synthèse des HAQ par PqsA a été caractérisée	145
2.4.3.3.6.2 PqsD possède plusieurs substrats et génère de nombreux produits	146
2.4.3.3.6.2.1 Le β-céto-décanoïl-CoA est-il un substrat de PqsD?	146
2.4.3.3.6.2.2 Un intermédiaire commun entre le DHQ et les HAQ?	147
2.4.3.3.6.2.3 Hypothèses sur l'identité du précurseur potentiel des HAQ produit par PqsD	et
PqsA	148
2.4.3.4 Les enzymes PqsB et PqsC fonctionnent-elles en complexe ?	150
2.4.4 Rôle des HAQ dans l'autolyse et l'iridescence chez P. aeruginosa	132
2.4.4.1 Les paramètres requis pour l'induction de l'autolyse et de l'iridescence varient d'u	ne
souche à l'autre dans une même espèce	153
2.4.4.2 Le HHQ et le HQNO affectent le phénotype d'iridescence et d'autolyse	
2.4.4.2.1 L'autolyse, associée à l'iridescence, témoigne d'un état de stress chez P. aeruginosa	154
2.4.4.2.2 Le HQNO inhibe l'apparition d'iridescence en bloquant la respiration cellulaire	155
2.4.4.2.3 Un excès de HHQ induirait un stress au sein de la bactérie, probablement via la voie	
respiratoire	
2.4.4.2.4 Nature du stress généré par la respiration cellulaire	
2.4.5 Conclusion du projet.	157
3 ÉTUDE DE LA FONCTION DE PQSE	159
3.1 INTRODUCTION: ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR PQSE	150
2.1.1 Deal in this to production do proprieto	160
3.1.1 PqsE induit la production de pyocyanine	120
3.1.1.1 Biosynthèse de la pyocyanine	
3.1.1.2 Régulation de la production de pyocyanine	
3.1.2 PasE active le stress oxydatif chez P. aeruginosa	103
3.1.2.1 Molécules induisant un stress oxydatif	
3.1.2.1.1 Anion superoxyde	165
3.1.2.1.2 Peroxyde d'hydrogène	166
3.1.2.1.3 Mécanismes et composés générant l'anion superoxyde et/ou le peroxyde d'hydrogène	166

3.1.2.2 Régulateurs contrôlant le stress oxydatif	
3.1.2.2.1 Le régulateur SoxR est activé en présence de superoxyde	16
3.1.2.2.2 Le régulateur OxyR est activé en présence de stress oxydatif	16
J.I.J FUSE active un grand nombre de gènes contrôlés par la granum garaine	1.
0.1.0.1 Identification des l'acteurs de virtilence affectés par PasE et contrôlée por le au	10
	1.6
5.1.3.2 Facteurs de regulation intervenant dans le quorum sensing de P. aeruginosa	16
3.1.3.2.1 Regulateurs transcriptionnels affectant le quorum sensing	17
3.1.3.2.2 Modecules-signal impliquees dans le quonim sensing	17
5.1.5.2.2.1 Diversite des molecules-signal	
3.1.3.2.2.2 Le quorum quenchina ou la degradation des molécules-signal	17
3.1.3.2.3 Role des petits ARN regulateurs dans le quorum sensing	17
3.1.3.2.3.1 Caracienstiques sinichtrelles des ARNne	10
3.1.3.2.3.2 Mécanismes d'action des ARNnc sur les ARN messagers	17
3.1.3.2.3.3 Mécanismes d'action des ARNnc sur les protéines	17
3.1.3.2.3.5 Petits ARN régulateurs contrôlant le QS chez P. aeruginosa	180
3.1.4 Objectifs du projet	182
3.1.4.1 Objectifs spécifiques au chapitre	18.
3.1.4.2 Méthodologie et approche globale.	18.
3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	184
3.2.1 Souches et conditions de culture	183
3.2.2 Quantification de l'activité beta-galactosidase	183
3.2.3 Phenotype Microarrays TM	186
3.2.4 Analyse de la résistance au stress oxydatif	186
3.2.5 Analyse du protéome de pasE par gel bidimensionnel	186
3.2.6 Marquage des dérivés de l'acide anthranilique au ¹⁴ Carbone	187
3.2.7 Séparation et analyse des fractions intracellulaires et extracellulaires, polaires et no	188
polaires et extracellulaires, polaires et no	n
polaires	188
	189
3.2.8.1 TLC (pour la séparation de molécules non polaires)	189
3.2.9 Analyses par LC-MS	189
3.2.10 Bioessai pour la détection des acyl homosérine lactones	190
3.2.11 Biologie moléculaire.	190
3.2.11.1 Extraction d'ADN plasmidique	191
3.2.11.2 Extraction d'ADN génomique	191
3.2.11.3 Extraction d'ARN	192
5.2.11.5.1 Furnication des acides nucléiques	100
5.2.11.5.2 Fiecipitation des acides nucleiques à l'alcool	103
Transmittal a la Divase pour eliminer l'Alin	102
Ochstruction et utilisation du vecteur mini-C i X-ph/A1-lac/	104
Construction du mini-C I A-DIIZA I-1807.	104
5.2.11.5.2 Excision du mini-CTX hors du chromosome et conservation du rapporteur transcripti	omnol
phzA1-lacZ 3.2.11.6 Construction des souches PA14 phzA1-lay of posE-web-A4-lay	195
DIZA I-IIX	196
	196
- "Thing of colors at caloures of Cripiages	197
	197
3.2.12.2 Criblage au moyen du rapporteur phzA1-lux	197
3.2.13.1 Fractionnement des ARN en fonction de leur taille	198
3.2.13.2 Gel de polyacrylamide d'électrophorèse à deux dimensions	198
3.2.14 Dot blot	198
3.2.15 SCOTS.	199
3.2.15.1 Isolement des acides nucléiques (étapes 1 et 2)	199
3.2.15.1.1 Extraction d'ADN génomique (étape 1)	200
3.2.15.1.2 Préparation de l'ADN ribosomal (étape 1)	200
3.2.15.1.3 Production d'ADN complémentaire (étape 2)	201
	/

3.2.15.1.3.1 Extraction de l'ARN	201
3.2.15.1.3.2 Transcription inverse: production d'ADN complémentaire	201
3.2.15.1.3.3 Enrichissement de l'ADNc par PCR	202
3.2.15.2 Biotinylation de l'ADN génomique (étape 1)	202
3.2.15.3 Hybridation de l'ADN ribosomal avec l'ADN génomique (étape 1)	202
3.2.15.4 Hybridation, normalisation et capture des ADNc (étape 3)	203
3.2.15.5 Enrichissement : sélection des ADNc présents uniquement chez la souche pqsE	
(étape 4).	204
3.3 RÉSULTATS	204
3.3.1 PqsE et les métallo-beta-lactamases	
	204
	205
	207
	200
	200
3.3.1.5 PqsE n'est pas une aryl-sulfatase	210
3.3.1.6 Homologies avec les RNases	211
3.3.1.7 Le substrat naturel de PqsE ne serait pas une molécule extracellulaire	211
3.3.2 Paramètres phénotypiques dépendant de la présence ou de l'absence de PqsE	212
3.3.2.1 La diminution du stress oxydatif est liée à l'absence de pyocyanine chez le mutar	<i>t</i>
pqsE ⁻	213
3.3.2.1.1 La diminution de transcription des gènes liés au stress oxydatif est due à l'absence de	tress
et non à une répression spécifique de ces gènes	213
3.3.2.1.2 La pyocyanine complémente partiellement un mutant pqsE	214
3.3.2.1.3 La pyocyanine est responsable du stress oxydatif induit par PqsE	217
3.3.2.2 Étude phénotypique du mutant pqsE	218
3.3.2.2.1 Comparaison entre pqsE', rhlR', phzC1'C2' et la souche sauvage	219
3.3.2.2.1.1 Les mutant rhlR et pqsE sont semblables mais non identiques	219
3.3.2.2.2 Étude phénotypique par Microarrays ^{TR} de Biolog	220
3.3.2.2.3 Confirmation des résultats obtenus par Biolog	222
3.3.2.3 Étude du protéome du mutant pqsE	223
3.3.2.3.1 Comparaison du mutant pqsE et du mutant phzM par gel de protéines bidimensionne	ı 224
3.3.2.3.2 Lien entre PqsE et les dipeptides cycliques ?	226
3.3.3 Lien entre PqsE et les HAQ	228
3.3.3.1 Comparaison des profils de molécules extracellulaires entre la souche sauvage e	t le
mutant pqsE par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (2D-TLC)	229
3.3.3.1.1 Analyse de la fraction extracellulaire non polaire	229
3.3.3.1.1.1 Identification de la molécule V	230
3.3.3.1.1.1.1 3 ^{ème} et 4 ^{ème} dimension de séparation chromatographique	230
3.3.3.1.1.1.2 La molécule V a un poids moléculaire de 144 Da	231
3.3.3.1.1.2 Identification de la molécule E	233
3.3.3.1.2 Analyse des fractions extracellulaire polaire et intracellulaires polaire et non polaire	234
3.3.3.2 Analyse et quantification des dérivés de l'acide anthranilique chez la souche sau	vage
et chez le mutant pqsE par LC/MS	235
3.3.3.2.1 Le mutant pqsE n'est pas affecté dans la production de HHQ, de PQS ou de HQNO	236
3.3.3.2.2 Analyse de la production du DHQ chez le mutant pqsE	237
3.3.3.2.3 Analyse des dérivés de l'acide anthranilique chez le mutant pqsE et chez la souche sa	uvage
5.5.5.2.5 Allaryse des delives de l'acide diffinalité que elle l'acide diffinalité de l'acide diffinali	238
3.3.3.2.3.1 Détection des dérivés de l'acide anthranilique de polarité semblable au PQS, HHC) et
	238
HQNO 3.3.3.2.3.2 Détection des dérivés de l'acide anthranilique de polarité semblable au DHQ	239
3.3.3.2.4 Identification des molécules VD279, VD295 et VD323	239
3.3.3.2.4.1 Ces trois molécules ne sont présentes qu'en absence de PqsE	239
	240
	240
	243
3.3.3.2.4.4 Fragmentation des molécules VD279 et VD295	244
3.3.3.2.4.5 VD279 est un produit de l'opéron pqsABCDE	243
3.3.3.2.4.6 La molécule VD279 ne possède pas de noyau indole	240
3.3.3.2.4.7 La présence de VD279 ne dépend pas de la pyocyanine ni de RhlR	24
3.3.3.2.4.8 Optimisation de la production de VD279	24:
3.3.3.2.4.9 Conditions de purification de VD279 et analyse par RMN	230
3.3.3.2.5 Lien entre PqsE et le VD279	25
3,3,3,2,5,1 PasE dégrade-t-il le VD279 ?	25

3.3.3.2.6 Fonction biologique du VD279	0.55
O.O.O.E.O.I EU VIDZI 3 II A AUCHII PIIPI ANIIMICMNIAN	
43E anecte la regulation de l'Operon DosAR(II)E	25/
Du transcribtion des genes de l'Operon par A Ri 116 art avenantée de la line	
La transcription des genes de l'opéron nos ARCDE et les UAC cont diminués le les	-
	~
impliques dans la fonction de la proteine Pase	0.00
Dion Chirc I 43L Et 163 AIIL	2 / 2
TO THE PROPERTY OF THE DESCRIPTION OF THE PROPERTY OF THE PROP	
	200
sauvage et le mutant posE par LC/MS. 3.3.5 Lien entre PosE et les régulateurs du guerre de la dégradation des AHL chez la souch	267
Dien chile I dall et les reputitipites du ditorina concina	
T 45E CLIVIII \ QUISSUITI SUF IS MAMA VOIA de réquisition de la puesuanina de	
Depression de la procratime dans un miliant lack everiment noch et leu al ID	0.00
on matant laste produit de la pyocyanine en ansence de Post	271
	. 273
	274
3.3.5.2. PqsE réprime un facteur de répression du quorum sensing	. 277
3.3.5.2.2 Étude du répresseur resal.	277
3.3.5.2.2.1 Un double mutant rsaL pqsE produit de la pyocyanine	. 278
1 day car chicold folicitolinelle en angence de Real	278
De represseur est exprinte tard dans un miliant lack	. 282
5.5.5.2.4 Les mutants last et full produisent aussi de la procvanine lorsqu'ils expriment chip	204
identification du l'acteur de repression bioqué par Page par mutogopàse eléctrice	005
5.5.0 Lien entre Past et les ARNnc	200
matagorious dicatolic et cholade sui nies de seu nin colonico	~~~
Nooner one a un ARN requirite de Pase par highermatique	200
our sation du logiciel lieu NAllen pour aligner les régions intergéniques de plusiques	
genomes	290
offisation du logiciel target RNA pour identifier les ARN s'hybridant sur l'ADNm de Di	.1D
*** ***********************************	
Outspardison des petits ARN presents chez PA1/ et chez la mutant anno	
Comparation de pont de pents ARN sur gel d'electrophorèse	202
Difficultivity des Annu pi concentration des notife ADA	
The state of the s)
***************************************	204
	nt
chez le mutant pqsE et absents chez la souche sauvage PA14	295
3.3.6.3.2.1 Vérification de la présence des petits ARN dans l'ADN complémentaire	296
3.3.6.3.2.3 Analyse des résultats obtenus par SCOTS : identification des petits ARN présents uniquement en absonce de Bass.	297
présents uniquement en absence de PqsE	
3.3.6.3.2.3.1 Identification des séquences intergéniques obtenues par SCOTS	298
J.J. U.J. 2. J. 2. Fresence des regions intercentques identifiées sur la bionis-	298
3.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	299
3.4.1 PasE est une métallo-β-lactamase unique	302
3.4.1.1 PqsE appartient à la grande famille des métallo-hydrolases mais ne clive pas de no	303
β-lactame	'au
3.4.1.2 PqsE n'appartient à aucune sous-famille existante de métallo-hydrolases	303
3.4.1.2.1 Caractéristiques communes avec les hydrolases métabolisant l'ARN	303
3.4.1.2.2 Caractéristiques communes avec les hydrolases se liant au fer.	504
3.4.2 PasE affecte de nombreux facteurs contrôlés par le quorum sensing chez P. aeruginosa	3U4
Odracienstiques du Hutant Dast. Selon les conditions evnérimentales	
3.4.3 Recherche du substrat de PqsE 3.4.3.1 PqsE n'agit pas sur los malécules circul les	307
3.4.3.1 PasE n'agit pas sur les molécules-signal les plus communes du quorum sensing	108
3.4.3.1.1 Résumé des molécules différemment produites entre pqsE et la souche sauvage	109
amore annual productes critic past. et la souche sauvage	109

3.4.3.1.2 Car	ractérisation du VD279	. 310
3.4.3.1.3 Pgs	E n'intervient pas dans la production des HAQ mais affecte la production d'acide	.,
anthranilique		311
3.4.3.1.4 Cor	mment peut-on affecter la transcription de l'opéron pqsABCDE sans altérer la produ	ction
de HAQ?		312
3.4.3.2 PqsE	agit sur un facteur intracellulaire	314
3.4.3.2.1 Un	substrat protéique pour PqsE ?	314
3.4.3.2.2 Lie	n entre PqsE et RhIR	315
3.4.3.2.2.1	PqsE et RhlR affectent différemment la transcription de l'opéron pqsABCDE, celle	de
mvfR et la pro	oduction de DHQImplication du C ₄ -HSL dans le lien entre PqsE et RhlR	310
3.4.3.2.2.2	Implication du C ₄ -HSL dans le lien entre Pase et Knik	210
3.4.3.3 La cib	ole de PqsE est un répresseur du quorum sensing contrôlé par LasRoresseur hypothétique est exprimé tardivement dans un mutant lasR	371
3.4.3.4 Le rép	a des homologues chez plusieurs espèces de Burkholderia	321
3.4.3.5 PqsE 3.4.3.6 Le sul	bstrat de PqsE doit être un petit ARN régulateur	322
3.4.3.6.1 Un	e activité phosphodiestérase pour PqsE	323
3.4.3.6.2 L'A	ARN régulateur potentiellement dégradé par PqsE n'est pas encore connu	324
	chniques d'identification de l'ARN régulateur que PqsE pourrait dégrader	
3.4.3.6.3.1	Identification par mutagenèse aléatoire	325
3.4.3.6.3.2	Identification par hybridation soustractive	326
3.4.3.6.4 Mo	ode d'action du petit ARN régulateur	327
3.4.3.6.5 Into	égration du rôle du C ₄ -HSL dans le modèle de régulation de la pyocyanine	327
3.4.3.6.6 Im	plication de Hfg sur l'ARN régulateur recherché	328
3.4.3.6.7 Ap	plication de l'hypothèse de l'ARN régulateur pour expliquer les phénotypes des mut	ants
5.79 et 10.41		329
3.4.4 Conclusion	du projet	330
CONCLUSION CÉNÉD	ALE	331
APPENDICES		333
APPENDICE A		335
TARIFALIDES STRUCTU	RES CHIMIQUES MENTIONNÉES DANS LA THÈSE ET UTILISÉES DANS L'ÉTUDE D	E LA
PIOSVNTHÈSE DES HAO)	335
A DRENDICE B		339
I sete bee colicues liti	LISÉES DANS CE DOCUMENT	339
	LISEES DANS CE DOCUMENT	
APPENDICE C	ILISÉES DANS CE DOCUMENT	345
A PREVIOUS D	ILISEES DANS CE DOCUMENT	340
APPENDICE D	FILISÉS DANS CE DOCUMENT	3/10
APPENDICE E		252
ARTICLES PUBLIES AU C	COURS DE LA THÈSE	
Hazan, R., He, J., Xi	iao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Astrakas, C., Déziel, E., Lép	ine,
F. & Rahme, L. G. (.	2010). Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iro	n in
Virulence. PLoS Pat	thog 6, e1000810	<i>3</i> 33
Vial, L., Groleau, M	f. C., Lamarche, M. G., Filion, G., Castonguay-Vanier, J., Dekimpe, V., Daig	zie,
	Deziel, E. (2010). Phase variation has a role in Burkholderia ambifaria nic	
	4, 49-60	357
	el, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in Pseudomonas	
aeruginosa: the tran	scriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. Microbiology 15	55,
712-723		359
Vial, L., Lepine, F.,	Milot, S., Groleau, M. C., Dekimpe, V., Woods, D. E. & Deziel, E. (2008).	
Burkholderia pseude	omallei, B. thailandensis, and B. ambifaria produce 4-hydroxy-2-alkylquino	line
analogues with a me	ethyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation.	J
Bacteriol 190, 5339	-5352.	361
Vial. L. Groleau M	1. C., Dekimpe, V. & Deziel, E. (2007). Burkholderia diversity and versatility	y: an
inventory of the extr	racellular products. J Microbiol Biotechnol 17, 1407-1429.	363
I énine F Dekimne	e, V., Lesic, B., Milot, S., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rahme, L. G. & Deziel	l. E
	c, r., Beste, B., Milot, G., Bestimpte, r., Mainer, G. r., Rainine, B. G. & Beste.	
(200//	***************************************	

produced by Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia thailandensis. Biol Chem 388, 83 APPENDICE F	
RESULTATS BRUTS DES PHENOTYPE MICROARRAYS	267
1 A14 versus phzC1 C2	260
1 A1+ versus pase	275
1 111 T VCI 343 I III (201
pqsE-versus pnzC1 C2	207
pqsb- versus rnik	202
AFFENDICE U	200
LISTE DES ADNC IDENTIFIES CHEZ LE MUTANT POSE- PAR LA MÉTHODE DU SCOTS	200
AFFENDICE IT	400
DONNEES RIVIN SUR LA STRUCTURE DE LA MOLECULE VD279	400
AFFENDICE L	411
EXPERIENCES ANNEXES A L'ARTICLE DU DHO (LÉPINE ET AL 2007)	411
DIOSTRIBESE DE DI-HYDROXYOUINOLINF (1)H(1)	410
=: = 1oo iiibiidacea dalia la biosvillilese (ili DH()	412
J.T.T.1.1 LCS SOUCHES QUI DIOQUISENT des HA() produisent également le DUO	410
J. T. T. L. L. D.	412
Ometique de Dioduction (til DMC) chez Peeridomones containese	
Legitoria des biecnisenis di DUO	410
	418
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	419

Mise en contexte

Pseudomonas aeruginosa est une γ-protéobactérie que l'on retrouve de manière ubiquitaire dans de nombreuses niches écologiques, telles que les sols et les milieux aquatiques ainsi que chez les plantes et les animaux. Cette grande diversité d'habitats témoigne de son aptitude à s'adapter rapidement et efficacement aux conditions environnementales auxquelles elle est soumise (Holloway, 1969). Cette grande faculté d'adaptation fait également de P. aeruginosa un redoutable pathogène opportuniste (Smith & Iglewski, 2003).

Les pathogènes bactériens infectent un grande diversité d'hôtes distincts, retrouvés tant dans le règne végétal qu'animal (Rahme et al., 1995). Bien que très différents les uns des autres, ils possèdent néanmoins tous certaines particularités communes telles que les facultés de colonisation de l'hôte, l'exploitation de ses ressources nutritives ainsi que des défenses spécifiques contre celui-ci (Rahme et al., 2000). Toutes ces aptitudes nécessitent de nombreux facteurs de virulence propres à chaque pathogène.

P. aeruginosa est connue pour infecter non seulement les plantes mais également les insectes, les nématodes et les mammifères (Rahme et al., 2000). Chez l'humain, elle est responsable de nombreuses maladies nosocomiales telles que des pneumonies, des infections du tractus urinaire et des septicémies chez les grands brûlés. Elle est également responsable d'une inflammation pulmonaire chronique chez les patients atteints de fibrose kystique (Berthelot et al., 2005; Pierce, 2005). Les mécanismes d'infection de P. aeruginosa sont nombreux et variés, comme en témoigne le nombre d'hôtes potentiellement sujets à une infection, la variété de maladies causées par ce pathogène chez l'homme, ainsi que la quantité impressionnante de facteurs de virulence qu'il produit (Berthelot et al., 2005; Mahajan-Miklos et al., 1999; Mahajan-Miklos et al., 2000; Plotnikova et al., 2000; Rumbaugh et al., 2000; Smith & Iglewski, 2003; Wolfgang et al., 2003). Les facteurs de virulence de P. aeruginosa facilitent entre autres la colonisation et l'invasion des tissus. Ils incluent les pili, les flagelles, les rhamnolipides, le cyanure d'hydrogène, la pyocyanine, les exotoxines, les lipopolysaccharides et des facteurs de perméabilité vasculaire. Des protéases permettent la dégradation de protéines de l'hôte et des élastases sont responsables de la dégradation de l'élastine, du collagène,

de la transferrine, d'immunoglobulines et d'autres composants de la réaction immunitaire, visant à la dégradation tissulaire de l'hôte (Rahme *et al.*, 2000). Les systèmes de sécrétion de type III (Engel & Balachandran, 2009; Hauser, 2009) et de type VI (Hood *et al.*, 2010; Lesic *et al.*, 2009) interviennent également dans la virulence de cette bactérie.

Les difficultés rencontrées dans les traitements contre *P. aeruginosa* sont multiples. La première provient de la résistance naturelle de la bactérie à de nombreux traitements antibactériens tels que les antibiotiques et les désinfectants, ce qui oblige médecins et chercheurs à diversifier leurs traitements contre ce pathogène. Cette remarquable faculté d'adaptation est basée sur le nombre impressionnant de facteurs de régulation présents chez cette bactérie. Le séquençage complet du génome de *P. aeruginosa* a en effet révélé la plus haute proportion de gènes de régulation jamais observée dans le monde bactérien à ce moment. Sur les 5570 cadres de lecture prédits, près de 521 présentent des motifs caractéristiques de régulateurs transcriptionnels ou de senseurs environnementaux, ce qui correspond à 8,4% du génome complet de la souche PA01 de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

La plupart des facteurs extracellulaires contribuant à la pathogénicité de *P. aeruginosa* sont contrôlés de manière très précise par un système de régulation appelé «quorum sensing» (QS) (Fuqua *et al.*, 1994). Ce système est basé sur la capacité que possède la bactérie de détecter la densité de population dans laquelle elle se trouve. Ainsi, lorsqu'une bactérie est mutée dans son système de QS, elle perd une bonne partie de ses capacités à infecter (Déziel *et al.*, 2005; Gambello *et al.*, 1993; Hassett *et al.*, 1999; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1995). Plusieurs observations montrent que le QS joue un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa*, tant dans les fonctions bactériennes que dans les réponses de l'hôte face à l'infection (de Kievit & Iglewski, 2000; Van Delden & Iglewski, 1998). Il est donc primordial d'approfondir les connaissances scientifiques sur ce système de régulation afin d'offrir une alternative prometteuse aux traitements anti-infectieux traditionnels.

1 <u>Hiérarchie des systèmes de quorum sensing chez</u> Pseudomonas aeruginosa

1.1 Introduction

1.1.1 Le «quorum sensing» chez P. aeruginosa

1.1.1.1 Généralités

Le «quorum sensing» (QS) est un système de régulation probablement présent chez la plupart des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. Il est impliqué dans des mécanismes biologiques aussi variés que la virulence (Smith & Iglewski, 2003), la bioluminescence (Lupp et al., 2003; Miyamoto et al., 2000), la conjugaison bactérienne (He et al., 2003), la symbiose (Loh et al., 2002), la motilité (Daniels et al., 2004), et la formation de biofilms (Tomlin et al., 2005). Le principe du QS est basé sur la régulation de l'expression des gènes en fonction de la densité d'une population bactérienne. Les bactéries produisent et libèrent dans leur environnement de petites molécules-signal ou auto-inducteurs (généralement de petits peptides dans le cas des bactéries à Gram-positif, des *n*-acyl-homosérine-lactones dans le cas des bactéries à Gram-négatif (Miller & Bassler, 2001)) dont la concentration extracellulaire augmente en fonction de la densité cellulaire dans le milieu. Une fois que cette concentration atteint un seuil critique, des régulateurs transcriptionnels sont activés et modifient à leur tour l'expression de certains gènes sous leur dépendance. Bien que la nature des auto-inducteurs, les mécanismes de réponse et la cible des gènes contrôlés par le QS puissent varier en fonction des espèces, le QS offre à tous les organismes qui le possèdent un système efficace de communication (Miller & Bassler, 2001). Il permet de synchroniser l'expression génique au sein d'une espèce ou d'une population mixte bactérienne, au point de modifier le comportement de

la communauté entière (de Kievit & Iglewski, 2000; Miller & Bassler, 2001). Ces dernières années, l'étude approfondie de différents systèmes de QS a démontré une complexité et un raffinement insoupçonnés, les bactéries utilisant souvent plus d'une molécule-signal, sécrétant certains inhibiteurs afin de brouiller la communication d'espèces rivales (Sio et al., 2006), et développant en définitive une interaction toujours plus fine entre les différents individus et leur habitat naturel (Williams, 2007; Williams & Camara, 2009). De plus en plus d'études montrent que le QS est également intégré dans un plus vaste contexte prenant en compte les aspects physiologiques de la cellule en réponse aux conditions environnementales. Ainsi plusieurs régulateurs transcriptionnels globaux interviennent et modulent la régulation des systèmes de QS chez les espèces de Pseudomonas (Juhas et al., 2005; Venturi, 2006).

A quelques exceptions près, les systèmes de QS chez les bactéries à Gram-négatif sont organisés de manière similaire, avec au minimum une synthase de type LuxI et un régulateur transcriptionnel de type LuxR, faisant référence aux protéines impliquées dans le QS chez *Vibrio fischeri* (Miller & Bassler, 2001). Les protéines de type LuxI sont responsables de la biosynthèse des acyl-homosérine-lactones (AHL) servant de signaux intercellulaires. Les protéines de type LuxR sont les régulateurs transcriptionnels activés par la formation d'un complexe avec leur auto-inducteur spécifique lorsque la concentration de celui-ci atteint un certain seuil (Fuqua *et al.*, 1994). Une fois activés, ils se fixent généralement sur un domaine de l'ADN situé dans la région promotrice d'un gène (Egland & Greenberg, 1999) et en régulent ainsi l'expression.

1.1.1.2 Systèmes de «quorum sensing» chez P. aeruginosa

Chez *P. aeruginosa*, il existe deux systèmes complets reconnus de QS basés sur des homologues des protéines LuxI et LuxR (Figure 1-1). Le système Las et le système Rhl possèdent chacun une synthase (respectivement LasI et RhII) responsable de la biosynthèse d'une AHL (respectivement le 3-oxo-dodécanoyl-acyl-homosérine-lactone ou 3-oxo-C₁₂-HSL, et le butanoyl-homosérine-lactone ou C₄-HSL) et un régulateur transcriptionnel (respectivement LasR et RhIR) activé par leur AHL propre (Juhas *et al.*, 2005). Ces deux systèmes sont impliqués dans l'expression de nombreux gènes (l'expression d'environ 6% du génome est affectée par le QS) dont la plupart des facteurs

de virulence chez P. aeruginosa (Hentzer et al., 2003; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2004).

Les mutants affectés dans leur système Las ou Rhl présentent une forte atténuation dans leurs capacités à induire une inflammation dans les modèles d'infection de souris brûlées (Rumbaugh *et al.*, 1999) ou une infection pulmonaire aigüe (Lesprit *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002) ou chronique (Wu *et al.*, 2001) chez les rats et les souris.

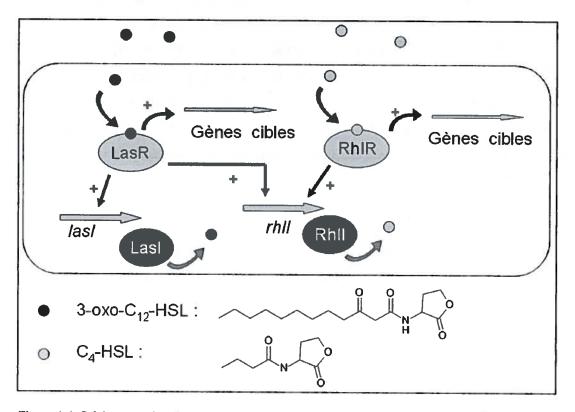


Figure 1-1. Schéma représentant le système de *quorum sensing* basé sur les AHL chez la bactérie *P. aeruginosa*.

1.1.1.2.1 Le système Las

Le système Las contrôle l'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence responsables de la destruction des tissus lors du processus d'infection (Pesci *et al.*, 1997). Cette activation transcriptionnelle nécessite une dimérisation de LasR ainsi qu'une association avec son auto-inducteur, le 3-oxo-C₁₂-HSL (Schuster *et al.*, 2004b; Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

Parmi les gènes directement régulés par le système Las, on retrouve des gènes codant pour l'élastase LasB, la protéase LasA, l'exotoxine ToxA et la phosphatase alcaline AprA (de Kievit & Iglewski, 2000; Jones *et al.*, 1993). Outre les gènes de virulence, le système Las active l'expression de la synthase LasI, ce qui permet de créer une boucle de rétroaction positive sur tout le système (Seed *et al.*, 1995). Enfin, le complexe LasR/3-oxo-C₁₂-HSL permet également d'activer la transcription de *rhIR* (Ochsner & Reiser, 1995; Pesci *et al.*, 1997) et de *rhII* (de Kievit *et al.*, 2002), induisant ainsi l'expression du second système de QS. Toutefois, le 3-oxo-C₁₂-HSL préviendrait également l'association du C₄-HSL au régulateur transcriptionnel RhIR (Pesci *et al.*, 1997). Ce second niveau de contrôle du système Las sur le système RhI permet une activation séquentielle des deux systèmes, car le système Las active le système RhI. Cependant, ce dernier étant inhibé en présence de 3-oxo-C₁₂-HSL, il ne pourra réellement s'activer que lorsque LasR et donc la concentration en 3-oxo-C₁₂-HSL aura diminué (Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

1.1.1.2.2 Le système Rhl

Le régulateur transcriptionnel RhIR couplé au C₄-HSL permet l'activation de certains gènes impliqués dans la réponse à différents stress et dans la virulence de *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci se trouvent *rhIAB* responsables de la synthèse de rhamnolipides, un biosurfactant sécrété par la bactérie, les deux opérons *phzAIBICIDIEIFIGI* et *phzA2B2C2D2E2F2G2* essentiels pour la production des phénazines dont la pyocyanine, ainsi que le gène de synthase *rhII* (Rasmussen *et al.*, 2005). Comme pour le système Las, l'induction du gène de l'AHL synthase permet une autorégulation de tout le système.

RhlR pourrait également agir comme répresseur en absence de son auto-inducteur, diminuant par exemple la transcription de *lasB* et celle de *rhlR* lui-même (Medina *et al.*, 2003a). D'autres chercheurs ont également rapporté que RhlR se dimérise et s'associe à l'ADN autant en présence qu'en absence de C₄-HSL et que le 3-oxo-C₁₂-HSL provoque la dissociation de ce complexe (Medina *et al.*, 2003b).

1.1.1.2.3 Les régulateurs LuxR orphelins

Il existe également d'autres régulateurs de type LuxR chez *P. aeruginosa*. Sur le site www.pseudomonas.com, 20 cadres ouverts de lecture (ORF) possèdent des domaines caractéristiques de cette famille. L'un de ceux-ci code un régulateur nommé QscR. Ce régulateur peut former des multimères avec LasR et RhlR (Chugani *et al.*, 2001; Ledgham *et al.*, 2003b). Bien qu'on ne lui connaisse aucun auto-inducteur propre, il est reconnu qu'il puisse interagir avec les AHL des systèmes Las et RhlR, complexifiant ainsi encore un peu plus les systèmes de QS chez *P. aeruginosa* (Fuqua, 2006; Lee, 2005; Lequette *et al.*, 2006). Toutefois, la fonction exacte de QscR et des complexes qu'il forme avec LasR et RhlR reste encore peu connue.

Le quatrième régulateur de type LuxR décrit dans la littérature est VqsR (Virulence ans Quorum Sensing Regulator). Celui-ci ne possède pas non plus d'auto-inducteur propre. Une mutation dans ce régulateur provoque la perte de production des AHL ainsi qu'une baisse de production des facteurs de virulence et une pathogénicité réduite dans un modèle d'infection chez les nématodes (Juhas et al., 2004; Juhas et al., 2005). Aucune analyse n'a pour l'instant été réalisée pour déterminer si VqsR pouvait également interagir et créer des dimères avec les autres régulateurs de type LuxR.

1.1.2 Objectif du projet

L'un des volets de mon projet de doctorat porte sur les interactions entre les systèmes Las et Rhl chez *P. aeruginosa*. En effet il a été rapporté que des souches mutées dans le gène *lasR* et donc théoriquement incapables d'exprimer les facteurs de virulences régulés par le QS, parviennent quand même à produire de nombreux facteurs de virulence en fin de phase stationnaire (Diggle *et al.*, 2002). Afin de comprendre la raison de cette expression tardive, je me suis dans un premier temps intéressée à suivre l'activation du système Rhl chez les mutants *lasR* en fin de phase stationnaire. Cette étude s'avère essentielle pour davantage approfondir les connaissances sur la régulation et l'expression des facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* et ainsi proposer des traitements anti-infectieux adéquats pour inhiber la virulence de cette bactérie. Les travaux liés à cette étude ont fait l'objet d'un article publié dans le périodique Microbiology en mars 2009. Ce dernier est présenté dans la section suivante.

1.2 Article

Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors.

Dekimpe, V. & Déziel, E..

Microbiology 155, 712-723 (2009).

Contribution : Elaboration des expériences, réalisation des expériences, analyse des résultats, rédaction.

1.2.1 Résumé - Summary

1.2.1.1 Résumé de l'article en français

P. aeruginosa utilise deux systèmes majeurs de quorum sensing (QS), les systèmes Las et Rhl, pour moduler l'expression d'un grand nombre de ses facteurs de virulence. Le système Las se situe au sommet de la hiérarchie du QS. Toutefois, plusieurs facteurs de virulence tels que la pyocyanine sont encore produits chez un mutant lasR dans certaines conditions. De plus, ces mutants apparaissent spontanément dans différents contextes environnementaux, dont les voies respiratoires des individus atteints de fibrose kystique. Par le biais de rapporteurs transcriptionnels *lacZ*, de quantification par LC/MS et de tests phénotypiques, nous avons investigué la régulation des facteurs du QS contrôlés par le système Las. Nos résultats montrent que l'activité du système Rhl est seulement retardée et non abolie dans un mutant lasR, ce qui permet l'expression de nombreux facteurs de virulence tels que la pyocyanine, les rhamnolipides et le C₄-HSL durant la fin de la phase stationnaire de croissance. De plus, à ce stade, RhIR est capable de contrer l'absence de LasR en activant plusieurs fonctions régulées par le système Las, telles que la production de 3-oxo-C₁₂-HSL et de PQS (Pseudomonas Quinolone Signal). P. aeruginosa est donc capable de pallier la déficience d'un des systèmes de QS en permettant au second système de prendre la relève. Ce travail démontre que la hiérarchie de QS est plus complexe que le modèle présentant simplement le système Las au-dessus du système Rhl.

1.2.1.2 Résumé de l'article en anglais

Pseudomonas aeruginosa uses the two major quorum sensing (QS) regulatory systems las and rhl to modulate the expression of many of its virulence factors. The las system is considered to stand at the top of the QS hierarchy. However, some virulence factors such as pyocyanin have been reported to still be produced in lasR mutants under certain conditions. Interestingly, such mutants arise spontaneously under various conditions, including in the airways of cystic fibrosis patients. Using transcriptional lacZ reporters, LC/MS quantification and phenotypic assays, we have investigated the regulation of QS-controlled factors by the las system. Our results show that activity of the rhl system is only delayed in a lasR mutant, thus allowing the expression of multiple virulence determinants such as pyocyanin, rhamnolipids and C4-HSL during the late stationary phase. Moreover, at this stage, RhlR is able to overcome the absence of the las system by activating specific LasR-controlled functions, including production of 3-oxo-C12-HSL and Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). P. aeruginosa is thus able to circumvent the deficiency of one of its QS systems by allowing the other to take over. This work demonstrates that the QS hierarchy is more complex than the model simply presenting the las system above the rhl system.

1.2.2 Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous and versatile bacterium involved in numerous pathogenic infections affecting immunocompromised individuals and those suffering from cystic fibrosis (CF) (Marshall & Carroll, 1991; Pier, 1985; Speert, 1985). This bacterium regulates most of its virulence determinants in a cell density-dependent manner via a mechanism called quorum sensing (QS). Such global regulatory systems are found in most bacterial species, and control several and diverse biological functions, such as virulence, bacterial conjugation, bioluminescence, and biofilm formation. (de Kievit & Iglewski, 2000; Donabedian, 2003; Loh et al., 2002; Miller & Bassler, 2001). QS is mediated by diffusible signaling molecules released in the external environment. These signals, when reaching specific concentrations correlated with specific population cell densities, bind to and activate their respective transcriptional regulators. In P. aeruginosa, two conventional complete QS systems are known: the synthases Lasl and RhII produce

the *N*-acyl homoserine lactones 3-oxo-C₁₂-HSL and C₄-HSL respectively, which induce their cognate LuxR-type transcriptional regulators LasR and RhlR, responsible for the activation of numerous QS-controlled genes (Juhas *et al.*, 2005; Pesci *et al.*, 1997). Among genes activated by these two regulators are the genes coding for the LasI and RhlI synthases. Since *N*-acyl homoserine lactones induce their own production, they are called autoinducers. More recently, a third, distinct QS system has been unveiled. It is composed of a transcriptional regulator from the LysR family, MvfR (PqsR), which directly activates two operons (*phnAB* and *pqsABCDE*) required for the biosynthesis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), including molecules involved in 4-quinolone signaling (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1999), and for the activation of many QS-controlled genes, via *pqsE* (Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006a; Farrow *et al.*, 2008). Among the HAQs, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) act as activators of the MvfR regulator, inducing a positive feedback loop typical of QS systems (Xiao *et al.*, 2006a).

OS regulation is a very complex and extensive network influencing, both positively and negatively, the transcription of maybe 5-10% of the P. aeruginosa genome (Hentzer et al., 2003; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003). The LasR regulator is known to initiate the QS regulatory system, as it activates the transcription of a number of other regulators, such as rhlR, defining a hierarchical QS cascade from the las to the rhl regulons (Latifi et al., 1996; Pesci et al., 1997). Over the last few years, many wholegenome transcriptomic studies have been published in order to identify genes that are under the control of LasR and/or RhlR (Hentzer et al., 2003; Rasmussen et al., 2005; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003). Specific directly activated genes were clearly identified as belonging to the rhl regulon, such as rhlAB (rhamnolipid biosynthesis), lecA (lectin), hcnABC (HCN production) and both phzABCDEFG operons (phenazine biosynthesis) (Latifi et al., 1995; Schuster et al., 2004b; Schuster & Greenberg, 2007; Whiteley et al., 1999; Winzer et al., 2000). However, the situation is not as clear for many LasR-controlled genes, for which it has not been possible to define a single consensus LasR binding site sequence in the promoter region, suggesting that some of these genes are activated indirectly (Schuster et al., 2004b; Schuster & Greenberg, 2007). Actually, most QS-regulated factors are more or less influenced by both LasR and RhlR, as is the case for the proteases LasA (staphylolytic protease) and LasB (elastase) (Freck-O'Donnell & Darzins, 1993; Hentzer et al., 2003; Nouwens et al., 2003; Schuster et al., 2003; Toder et al., 1994; Wagner et al., 2004). Thus QS plays a predominant role in the regulation of virulence determinants in P. aeruginosa. Surprisingly, however, there are increasing reports that lasR mutants occur frequently in the natural environment (Cabrol et al., 2003), in airways from CF individuals (D'Argenio et al., 2007; Smith et al., 2006), in intubated patients (Denervaud et al., 2004) and in individuals suffering from bacteraemia, pneumonia or wound infection (Hamood et al., 1996). This is intriguing, since the LasR regulator is largely considered essential for full P. aeruginosa virulence (Preston et al., 1997; Rumbaugh et al., 1999; Storey et al., 1998).

The LasR transcriptional regulator is generally considered to sit at the top of the QS hierarchy in *P. aeruginosa* (Latifi *et al.*, 1996). However, we and others have observed that the phenazine pyocyanin is overproduced by *lasR* mutants at the late stationary phase (Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2003). As shown in Figure 1-2, a *lasR* mutant produces less pyocyanin during early growth phases, although, at the end of logarithmic and during early stationary phase, pyocyanin begins to be produced. During late stationary phase, after 24 hours of cultivation, the *lasR* mutant cultures contain much more pyocyanin than cultures of the wild type strain (35 mg/l compared to 2.5 mg/l, respectively). This is unexplained, since pyocyanin production is known to be regulated by QS (Latifi *et al.*, 1995). The regulator of the pyocyanin biosynthesis genes (*phz* genes) is RhlR (Brint & Ohman, 1995), whose transcription is considered to require LasR (de Kievit *et al.*, 2002; Latifi *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997). In theory, pyocyanin production is thus expected to be absent in *lasR* mutants, whereas experimental data show that it is actually only delayed (Figure 1-2).

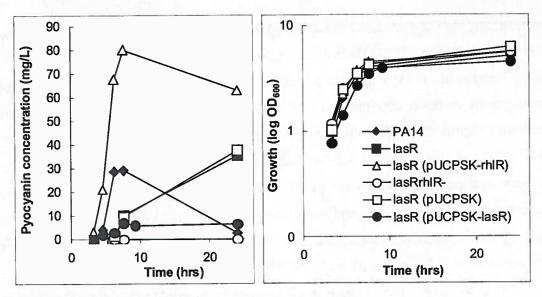


Figure 1-2. Expression of pyocyanin is delayed in a lasR mutant.

P. aeruginosa lasR mutant containing a constitutive rhlR (pUCPSKrhlR) or lasR (pUCPSKlasR) expression vector or the same vector without rhlR or lasR (pUCPSK) compared with the wild type and the lasR rhlR mutant.

In order to better understand the specific role of LasR and its involvement in expression of virulence factors, we have characterized the expression of QS-controlled determinants in a *lasR*⁻ mutant and have observed that during stationary phase, many QS-regulated virulence factors are expressed. Our data show that at this stage of growth, the RhlR regulon is activated. Moreover, we found that RhlR is able to induce LasR-regulated genes (including some considered specific such as *lasl*) in absence of *lasR*, unveiling a new mechanism for the bacteria to by-pass a defect in its QS regulation, allowing RhlR to induce the *las* system when LasR is non-functional.

1.2.3 Methods

1.2.3.1 Strains, plasmids and growth conditions

Table 1-1 lists strains and plasmids. Bacteria were routinely grown in Tryptic Soy Broth (TSB) medium at 37°C in a roller drum, with appropriate antibiotics when required (carbenicillin 300 mg/l, tetracycline 75 mg/l for *P. aeruginosa*; carbenicillin 100 mg/l and tetracycline 15 mg/l for *E. coli*). TSB plates contained 1.5% agar. For pyocyanin and rhamnolipid detection, King's A medium was used (King *et al.*, 1954). All measurements

of optical density and absorbance were obtained with a Thermo Scientific NanoDropTM 1000 Spectrophotometer.

Table 1-1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains	plasmids used in this study. Characteristics	Source or reference
E. coli DH5α	supE44 ΔlacU169 (Δ80	(Hanahan, 1983)
	lacZ∆M15) hsdR17 recA1	(, 1903)
	endA1 gyrA96 thi-1 relA1	
P. aeruginosa / Lab #		
PA14 / ED14	Clinical isolate UCBPP-PA14	(Rahme et al., 1995)
PA14 lasR / ED69	lasR::Gm derivative of ED14	(Déziel et al., 2004)
PA14 lasR rhlR / ED266	rhlR::Tc derivative of ED69	This study
S. aureus strain Newman	Laboratory strain	ATCC 25904
Plasmids		11100 23704
pMIC61 (pUCPSK-lasR)	lasR in pUCPSK with lac promoter as a Hind III-EcoRI fragment (5'-3' lasR)	Kindly donated by John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia
pMIC62 (pUCPSK-rhlR)	rhlR in pUCPSK with lac promoter as a Hind III-EcoRI fragment (5'-3' rhlR)	Kindly donated by John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia
pPCS1002	pLP170 containing rhlR-lacZ	(Pesci et al., 1997)
pSB224.10A	pRIC380 suicide vector carrying rhlR::Tc	(Beatson et al., 2002b)
pVD1	pDN19 containing <i>las1</i> with its native promoter, Tc ^r	This study
pME3853	pME6010 with a 174 bp <i>las1</i> upstream fragment and translational <i>las1</i> :: <i>lacZ</i> fusion containing the first 13 <i>las1</i> codons, Tc ^r	(Pessi et al., 2001)
pUCPSK	E. coli-P. aeruginosa shuttle vector	(Watson et al., 1996)
pLJR50	lasBp-lacZ transcriptional reporter fusion; contains nt - 190 to +4 of the lasB promoter region, Cb ^r	(Toder et al., 1994)

An isogenic *lasR⁻rhlR⁻* double mutant was generated by allelic exchange of the *rhlR* gene in a *lasR⁻* background with pSB224.10A using sucrose counterselection as described (Beatson *et al.*, 2002b).

Standard methods were used to manipulate DNA. The pDN19 plasmid (Nunn et al., 1990) was used to construct pVD1 containing the lasI gene under its own promoter. A region comprising from 305 bp upstream to 170 pb downstream of the lasI ORF was amplified and inserted between XbaI and HindIII in the pDN19 multiple cloning site. The gene fragment was generated from genomic DNA using PCR with primers 5'-GCTCTAGATTTTGGGGCTGTGTTCTCTC-3' and 5'-CCCAAGCTTACTCGAAGTACTGCGGGAAA-3'. The construction was confirmed by effective complementation of a lasI mutant. Plasmids were introduced by electroporation (Choi et al., 2006).

lasR subcultures were carried out as follows: a first preculture was made at day 1 and used to inoculate fresh medium for day 2. The latter was used to inoculate fresh medium for day 3. Pyocyanin was measured during each day of culture.

1.2.3.2 β-galactosidase activity assay

Bacteria containing the gene reporter fusions were routinely grown overnight from frozen stocks in TSB with appropriate antibiotics, then subcultured in triplicate at a starting OD_{600} of 0.05 without antibiotic. Culture samples were regularly obtained for determination of growth (OD_{600}) and β -galactosidase activity (Miller, 1972). N-butyryl-L-homoserine lactone $(C_4\text{-HSL})$ was purchased from Sigma-Aldrich and the stock solution prepared in acetonitrile.

1.2.3.3 Quantification of rhamnolipids, pyocyanin, AHLs and HAQs

Detection and measurements were performed by LC/MS. For pyocyanin, AHLs and HAQs, 480 µl of culture samples were taken at regular intervals, used for determination of growth (OD₆₀₀), and mixed with 120 µl acetonitrile containing 50 mg/l 5,6,7,8-tetradeutero-PQS for a final concentration of 10 mg/l as internal standard. After centrifugation, 20 µl of the supernatants were directly injected for LC separation on an Agilent HP1100 HPLC system equipped with a 3x150 mm C8 Luna reverse-phase column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A 1% acidified water/acetonitrile gradient was used as the mobile phase at a flow rate of 0.4 ml/min, split to 10% with a Valco Tee. A Quattro II (Waters, Mississauga, Ont., Canada) triple quadrupole MS was used for

molecule detection. Data acquisition was performed in full scan mode with a scanning range of 130-350 Da. Precise quantification of C₄-HSL and 3-oxo-C₁₂-HSL was performed in MS/MS, as described previously (Déziel *et al.*, 2005). For rhamnolipid quantification, 500 µl of culture samples were taken at regular intervals, used for determination of growth (OD₆₀₀), and diluted with an equivalent volume of methanol. After centrifugation, 20 µl of the supernatants were injected for LC/MS analysis as described previously, using 16-hydroxy-hexadecanoic acid as internal standard (Déziel *et al.*, 1999, Lépine *et al.*, 2002).

1.2.3.4 Elastase and protease enzymatic assays

TSB plates supplemented with 1% skim milk were inoculated with 10 μ l from cultures at OD₆₀₀ = 3. Plates were incubated at 37°C for 3 days. For specific LasB elastolytic activity, we used a protocol adapted from others (Bjorn *et al.*, 1979). Briefly, filter-sterilized culture supernatant samples (100 μ l) from late stationary phase cultures were mixed with 5 mg elastin Congo red (Sigma) and 300 μ l Tris-HCl 0.1 M pH 7.2. Release of Congo red from degraded elastin was measured at A₄₉₅ after 2 hrs of incubation in 37°C followed by centrifugation. For assessment of LasA staphylolytic activity, 4.5 ml of *Staphylococcus aureus* overnight cultures were boiled for 15 min. and 100 μ l was mixed with 300 μ l of filtered culture supernatants. The OD₆₀₀ was measured after 2h of incubation at 37°C with agitation. All experiments were carried out in triplicate.

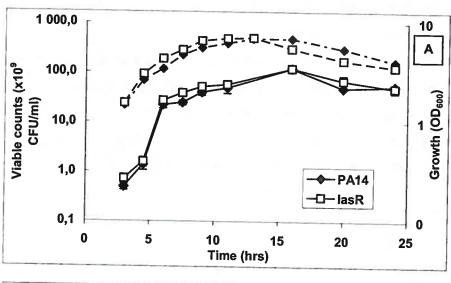
1.2.4 Results

1.2.4.1 The expression of RhIR-regulated factors is only delayed in absence of LasR

Based on previous observations reporting late pyocyanin production in *lasR* mutants, we decided to investigate the mechanism involved in this phenomenon, as an introduction to explore QS during the stationary phase.

Since RhIR is the known regulator of the *phz* genes, we hypothesized that late pyocyanin production is due to RhIR activity. In the absence of *lasR*, RhIR should activate the expression of the *phz* genes at the late stationary phase, and in its absence, no

pyocyanin should be produced. As shown in Figure 1-2, unlike the *lasR*⁻ mutant, the *lasR*⁻ *rhlR*⁻ double mutant does not produce this phenazine at all. Moreover, *lasR*(pUCPSK-*rhlR*), which constitutively expresses *rhlR* from a plasmid, produces pyocyanin at the same time as the wild type, confirming that RhlR is responsible for the timing of pyocyanin production. As expected, continued expression of *rhlR* results in higher production of pyocyanin. LasR(pUCPSK) acts like the *lasR*⁻ mutant, confirming that the vector does not influence pyocyanin expression. Finally, *lasR*⁻ complemented with pUCPSK*lasR* does not overproduce pyocyanin, unlike the *lasR*⁻ mutant, showing that the *lasR* mutation is responsible for this phenotype. It is also noteworthy that a *lasI* mutant presents the same pyocyanin overproduction phenotype than the *lasR*⁻ mutant (data not shown). To ensure that optical density during all growth stages and particularly during stationary phase truly reflects the number of living bacterial cells, we also determined the viable cell counts. As expected, growth rates and survival of the *lasR*⁻ mutant and the wild type are essentially the same (See Figure 1-3A), thus confirming that the differences in pyocyanin production is not the result of variations in the number of viable cells.



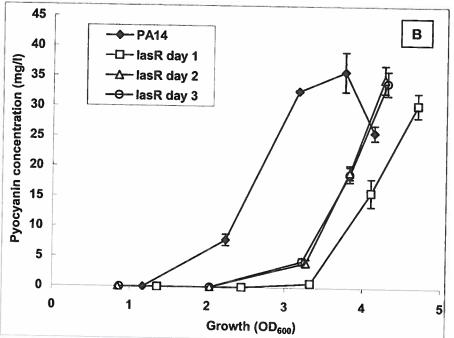


Figure 1-3. The delay in pyocyanin expression in a $lasR^-$ mutant is not due to secondary mutation or to a difference in the concentration of living cells.

(A) Growth kinetics of wild type and *lasR* strains. Experiments were made in triplicate. Continuous lines: Viable count, discontinuous lines: optical density. (B) Pyocyanin concentration in cultures of the wild-type strain and of the *lasR* mutant inoculated from overnight, I day-old or 2 days-old cultures that had been transferred into fresh medium every 24 hrs.

To make sure this late pyocyanin production is not due to a spontaneous mutation that might have occurred in the lasR background, we have subcultured a culture of the lasR mutant on three consecutive days in fresh medium, every time monitoring the

production of pyocyanin. Consistently, the cultures had to reach the late stationary phase before producing pyocyanin, indicating that this phenotype in not due to accumulation of secondary mutations during cultivation (See Figure 1-3B).

If RhlR is present and active during the late stationary phase in a *lasR* mutant, then we should be able to detect RhlR-regulated factors other than pyocyanin. The *rhlAB* and *rhlC* genes, coding for enzymes involved in rhamnolipid biosynthesis, and *rhlI*, coding for the C₄-HSL synthase, are all directly regulated by RhlR (de Kievit *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2003). We precisely quantified rhamnolipids and C₄-HSL in *lasR*, *lasR rhlR* and *lasR* (pUCPSK-*rhlR*) cultures. As shown in Figure 1-4, a *lasR rhlR* double mutant is unable to synthesize rhamnolipids or C₄-HSL respectively, while the *lasR* mutant produces these molecules with a delay, essentially in late stationary phase. These results support the hypothesis that expression of the *rhl* regulon is only delayed in a *lasR* mutant. The production of C₄-HSL and rhamnolipids was restored to levels similar to wild type when the *lasR* mutant was transformed with a *rhlR* expression vector, confirming that RhlR is responsible for theses phenotypes. These results show that the delayed expression of RhlR-controlled phenotypes in a *lasR* background can be restored by expressing *rhlR*.

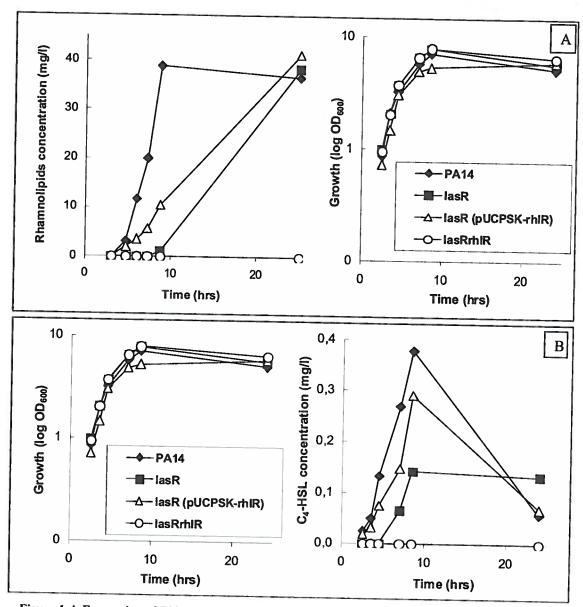


Figure 1-4. Expression of RhIR-controlled factors is delayed in a lasR mutant.

P. aeruginosa wild type and lasR mutant containing or not a constitutive rhIR expression plasmid (pUPCSK-rhIR) are compared. Production of (A) rhamnolipids and (B) C₄-HSL.

In order to provide additional evidence that RhlR is indeed expressed in a *lasR* mutant, we evaluated the transcription of *rhlR* with a *lacZ* fusion reporter. As shown in Figure 1-5, maximal *rhlR* transcription occurs at the early stationary phase in the wild type strain. Furthermore, it follows a similar expression pattern in the *lasR* mutant background, but at lower levels. Still, during late stationary phase, level of *rhlR* expression slightly increases in a *lasR* while it decreases in the wild type. These data

support the significant presence of RhlR in *lasR* mutants during late stationary phase, as previously reported (Diggle *et al.*, 2003).

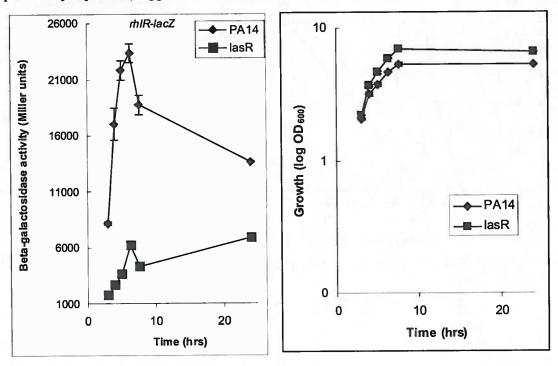


Figure 1-5. rhlR transcription in lasR mutants increases during late stationary phase.

(A) Beta-galactosidase activity using the pSC1002 vector containing the rhlR-lacZ transcriptional reporter.

(B) Growth kinetics as a function of time.

That the production of proteolytic enzymes such as LasA and LasB, responsible for staphylolytic and elastolytic activities respectively, is under LasR regulation is well established (Rust et al., 1996; Storey et al., 1998; Toder et al., 1991). However, there are indications they might also be under partial RhlR control (Brint & Ohman, 1995; Diggle et al., 2003; Pearson et al., 1997). To evaluate global protease activity of the strains, the wild type strain, and lasR and lasR mutants were inoculated on solid medium containing skim milk. Protease activity is visible for the lasR mutants while the double mutant is unable to degrade milk proteins (Figure 1-6).

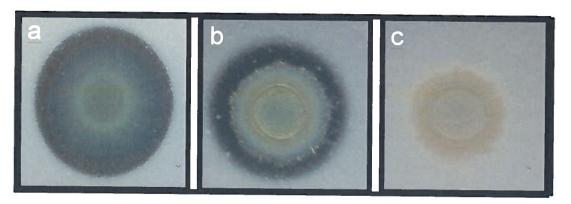


Figure 1-6. Protease activity is expressed by a lask mutant but not by a lask rhlk mutant. Bacteria (10µl from a culture $OD_{600} = 3$) were plated on TSB agar containing 1% skim milk and incubated for 3 days. Protease activity is revealed by a clearing halo due to casein degradation. (A) wild-type PA14 strain; (B) lask mutant; (C) lask rhlk mutant.

Since this test only indicates general proteolytic activity, it was interesting to target specific proteases. Figure 1-7A shows that the *lasR* mutant is able to activate *lasB* expression late in stationary phase, while the double *lasRrhlR* mutant cannot. Detection of LasB activity confirmed these results. During late stationary phase, the *lasR* mutant shows significant elastolytic activity, which is nearly as important as in *lasR* (pUCPSK-*rhlR*) (Figure 1-7B). Finally, Figure 1-7C shows that the wild type and the *lasR* mutant, complemented with *rhlR* or not, expresses LasA activity, while the *lasRrhlR* double mutant does not. Taken together, all these results indicate that the expression of many QS-controlled factors is only delayed when LasR is defective.

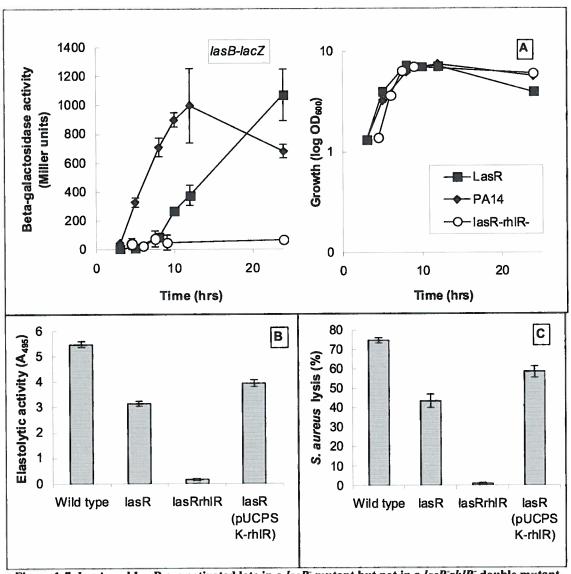


Figure 1-7. LasA and LasB are activated late in a lasR mutant but not in a lasR rhlR double mutant.

(A) Transcription of the lasB gene; (B) Elastolytic (LasB) activity; (C) staphylolytic (LasA) activity.

1.2.4.2 RhIR controls factors generally considered to be solely regulated by LasR

Another observation we and others have made is that not only pyocyanin but also PQS is produced during late stationary phase by a *lasR* mutant (Déziel *et al.*, 2004; Diggle *et al.*, 2003). This was unexpected since the final step in PQS synthesis is catalyzed by the *lasR* dependant PqsH enzyme (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; Whiteley *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2006b). Of note, there is a close correlation

between the timing of production of both PQS and pyocyanin in *lasR* mutant backgrounds (Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2002; Diggle *et al.*, 2003). To test if RhlR might also be responsible for this effect, we quantified PQS production by the wild type and the *lasR*, *lasR* rhlR and *lasR* (pUCPSK-rhlR) mutants. As shown in

Figure 1-8A, during the exponential and early stationary growth phases, PQS production is totally absent in the double mutant and barely detectable in the *lasR* mutant unless *rhlR* is expressed, which leads to a substantial reduction in the delay observed for that mutant. The same reduction of PQS is observed in a *lasI* mutant, and can also be restored by overexpressing RhlR in that mutant (data not shown). At the late stationary phase however, the concentration of PQS in *lasR* mutant cultures is similar to the wild type, while the double mutant still shows no detectable production. These data explain the late PQS production in a *lasR* mutant by the activity of RhlR.

We then asked whether *lasI*, probably the most specific LasR-regulated gene, which codes for the autoinducer synthase producing $3\text{-}oxo\text{-}C_{12}\text{-}HSL$, might also be regulated by RhIR. As expected from the above data, we found that $3\text{-}oxo\text{-}C_{12}\text{-}HSL$ production is greatly increased in *lasR* (pUCPSK-*rhIR*) compared to the wild type strain, at the same optical density (

Figure 1-8B). It also shows that 3-oxo- C_{12} -HSL is eventually produced in a lasR mutant at late stationary phase, but is totally absent if rhlR is also defective.

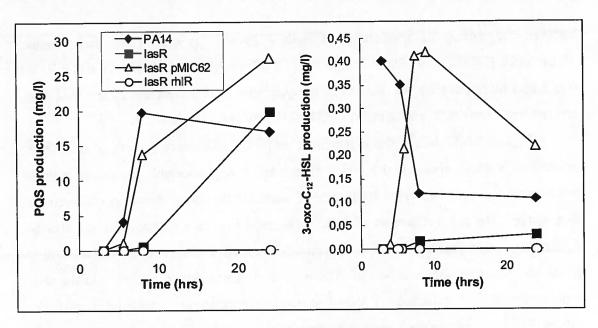


Figure 1-8. Production of PQS and 3-oxo-C₁₂-HSL requires *rhlR* in absence of *lasR*. LC/MS analysis from culture supernatants. Production of (A) PQS and (B) 3-oxo-C₁₂-HSL.

1.2.4.3 RhIR controls last in a heterologous system

In order to further identify RhIR as an alternative activator of *lasI* transcription in absence of a functional LasR, we constructed a heterologous system in *Escherichia coli*. A vector comprising the *lasI-lacZ* gene reporter was introduced in the DH5α strain. In the presence of the *rhIR* gene constitutively expressed on another compatible plasmid, and with addition of its autoinducer C₄-HSL, beta-galactosidase activity was greatly enhanced in the *E. coli* strain, while only basal expression was detected in absence of *rhIR* or C₄-HSL (Figure 1-9A). To confirm 3-oxo-C₁₂-HSL production through activation by RhIR, a vector containing *lasI* under its native promoter was introduced into DH5α. 3-oxo-C₁₂-HSL was detected in this heterologous system only in presence of both RhIR and its autoinducer C₄-HSL (Figure 1-9B).

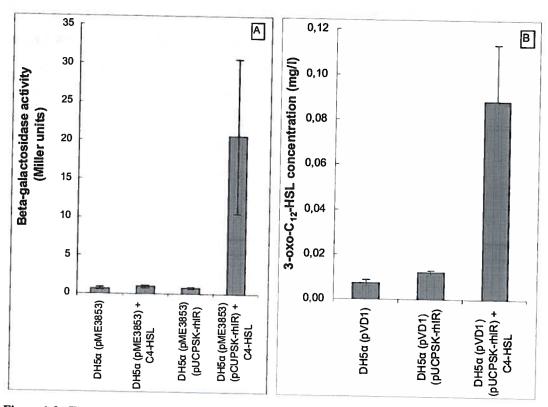


Figure 1-9. The lasI gene is activated by RhIR in a heterologous E. coli system. Heterologous system in a DH5 α strain in presence of either or both C₄-HSL (5 mg/l) and rhIR (pUCPSK-rhIR). (A) lasI-lacZ expression (pME3853); (B) 3-oxo-C₁₂-HSL production in presence of the lasI gene with its native promoter (pVD1).

1.2.5 Discussion

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen that relies on its impressive ability to coordinate gene expression in order to compete for nutrients or colonization against other species. QS appears essential for this bacterium for a better competitiveness in clinical or environmental niches. The QS LasR transcriptional regulator is known to control a wide array of virulence-associated P. aeruginosa factors. Nevertheless, several reports mention the high frequency of lasR mutations among clinical and environmental isolates (Cabrol et al., 2003; D'Argenio et al., 2007). Most intriguingly, some lasR mutants still produce QS-regulated virulence factors such as pyocyanin (Heurlier et al., 2005), and naturally occurring lasR mutants have been isolated from wounds or intubated patients (Denervaud et al., 2004; Hamood et al., 1996). It was thus interesting to better analyze the involvement of LasR in the expression of QS-regulated virulence determinants.

This study provides new insights into the interplay between the *las* and the *rhl* QS systems in *P. aeruginosa*, and demonstrates that a *lasR* mutation does not lead to loss of virulence factors. The *rhl* regulon expression is delayed to the late stationary phase in a *lasR* mutant, and is thus responsible for the late production of virulence factors in this background, such as pyocyanin, QS signaling molecules and proteases. These observations provide a solid basis allowing us to explain numerous inconsistencies in previous reports, and bring some clarifications to the *P. aeruginosa* QS model, as summarized in Figure 1-10.

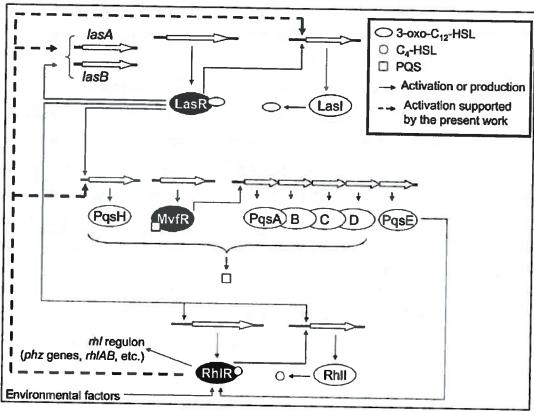


Figure 1-10. Proposed model for RhIR influence on the las regulon.

Basal expression of *lasl* leads to weak production of 3-oxo-C₁₂-HSL. This signaling molecule binds to some LasR regulators produced due to basal transcription of *lasR*. Once LasR is bound to its autoinducer, it activates the *las* regulon, leading to increased *lasI* and *lasR* transcription and activation of the *rhl* regulon. Our present work reveals an overlap between the *las* and *rhl* regulons where the *las* system is activated by the RhIR regulator. In presence of a *lasR* mutation leading to loss of its function, residual *rhII* and *rhIR* transcriptions, maybe combined to environmental factors, will allow activation the *rhI* regulon, but with a marked delay due to lack of *rhII* and *rhIR* transcriptional activation by LasR. Eventually, when the bacteria reach stationary phase, RhIR is present and functional to activate numerous virulence factors such as pyocyanin, rhamnolipids, proteases, and signaling molecules including PQS and 3-oxo-C₁₂-HSL.

1.2.5.1 RhIR-regulated factors are expressed late in a lasR mutant.

The delayed production of pyocyanin in a *lasR*⁻ mutant background as been anecdotically observed in numerous reports (Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2002; Diggle *et al.*, 2003; Heurlier *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2001; Lujan *et al.*, 2007; Salunkhe *et al.*, 2005a). That RhlR might be involved in that production has been suggested, although no evidence was presented (Diggle *et al.*, 2003). Here we present evidence for the role the RhlR regulator in pyocyanin production in a *lasR*⁻ mutant, since no production can be observed in a *lasR*⁻ double mutant and production is advanced in a *lasR*⁻ mutant complemented with *rhlR*.

The activity of RhlR during stationary phase in a *lasR*⁻ mutant was confirmed by the delayed production of other RhlR-controlled factors, C₄-HSL and rhamnolipids. Others noticed the presence of rhamnolipids during this stage. Van Delden *et al.* proposed that environmental factor(s) could be responsible for the induction of some virulence factors in a *lasR*⁻ mutant (Van Delden *et al.*, 1998), and that this induction should be mediated by RhlR. In another study, Köhler *et al.* reported rhamnolipid production by *lasR*⁻ and *lasI* mutants (Kohler *et al.*, 2001). Interestingly, the delayed production of pyocyanin and rhamnolipids in a *lasR*⁻ background observed in our work seems to correlate with the delayed accumulation of C₄-HSL and PQS. These signals both positively upregulate the *rhl* system. Our results add new evidence that LasR mainly acts as an exponential growth phase activator on several RhlR-dependent factors.

1.2.5.2 The expression of of the rhl system is maintained in a lasR mutant.

The above results can be explained by the fact that RhlR is expressed in a lasR mutant, as confirmed by a transcriptional rhlR-lacZ reporter, showing reduced but sustained transcription of rhlR. This finding contradicts the prevailing concept that the rhl system is inactive in absence of a functional LasR (Latifi et al., 1996). However, the available literature on the QS system in P. aeruginosa is largely based on experiments carried out during early growth stages. Indeed, Van Delden et al. (1998) had previously noticed significant rhlR expression in a lasR mutant background during the stationary phase, using the same reporter than we did. Maybe the *lacZ* reporter used by Latifi et al (1996) was less sensitive or difference in growth conditions modified the response. Nevertheless, our results agree that the rhl system is indeed under-expressed during the exponential and early stationary growth phase in a lasR mutant, but importantly seems to maintain a higher level of activity than in the wild type during late stationary phase when lasR is absent. Still, our results are in agreement with induction of the rhl system by LasR (Latifi et al., 1996). Most probably, basal rhlR and rhll transcription leads to the autoinduction of the rhl QS system in a lasR mutant background. It is also possible that environmental conditions are involved in that induction, since factors such as starvation (Van Delden et al., 1998), phosphate and iron (Jensen et al., 2006) have an influence on RhIR activation.

1.2.5.3 RhIR partially controls LasR-specific factors in absence of a functional LasR regulator.

Some LasR-dependent factors can be expressed in absence of this regulator, RhlR apparently acting as a surrogate activator. Indeed, PQS was detected in late stationary phase of a lasR mutant (Déziel et al., 2005; Diggle et al., 2003). Using a heterologous system, we found that the gene coding for the specific autoinducer synthase of LasR, lasI, is also transcriptionally activated by RhlR, and this is accompanied by the production of the corresponding AHL. That some activities known to be LasR-regulated are also affected by RhlR was observed before. Numerous proteolytic enzymes responsible for elastolytic (via the lasB gene) and staphylolytic activities (via the lasA gene) were initially reported to be specifically under the control of LasR (Rust et al., 1996; Storey et al., 1998; Toder et al., 1991), although these activities were also reported to be also partially under RhlR regulation (Brint & Ohman, 1995; Diggle et al., 2003; Pearson et al., 1997). The absence of a correlation between lasR and lasB transcription in some clinical and environmental P. aeruginosa strains was noted (Cabrol et al., 2003). Our data suggest this is explained by the additional control of lasB by RhlR.

In agreement with the work presented here, evidence for production of 3-oxo-C₁₂-HSL in some *lasR* mutants was reported by Sandoz *et al.* (Sandoz *et al.*, 2007). However, they suggested that this phenotype was due to compensatory mutations, while this is not the case in the present work. Production of 3-oxo-C₁₂-HSL in a *lasR* mutant would suggest that the bacterium is wasting resources, since no LasR protein is present to be activated by this autoinducer. However, it is known that this molecule also plays a role in *P. aeruginosa* pathogenicity as a virulence factor inducing inflammation *in vivo* (Qazi *et al.*, 2006; Shiner *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002) and accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils (Tateda *et al.*, 2003; Vikstrom *et al.*, 2005). N-acyl homoserine lactones are also signaling molecules involved in intra- and inter-species communication, which allow *P. aeruginosa* to compete or collaborate with other bacterial species (Eberl & Tummler, 2004; Juhas *et al.*, 2005; Qazi *et al.*, 2006; Riedel *et al.*, 2001; Shiner *et al.*, 2005; Williams, 2007). Interestingly, another QS regulator, QscR, can bind to 3-oxo-C₁₂-HSL (Ledgham *et al.*, 2003) and requires this signaling molecule to regulate some genes (Lee *et al.*, 2006; Lequette *et al.*, 2006). 3-oxo-C₁₂-HSL can thus be valuable

even in absence of the LasR regulator. PQS production in a *lasR*⁻ mutant has also its importance, since it allows the activation of the third QS system in *P. aeruginosa* (Diggle *et al.*, 2006a; Xiao *et al.*, 2006a), which affects expression of multiple virulence factors (Calfee *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006b), with a positive effect on the *rhl* regulon (Diggle *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2006; McKnight *et al.*, 2000).

1.2.5.4 LasR is a direct and indirect regulator of QS-controlled genes

In light of these elements, it appears that at least some of the known LasR-regulated genes are not strictly controlled only by this regulator. Although direct binding of LasR to some promoters such as that of *lasB* has been reported (Schuster *et al.*, 2004b), here we confirm that at least *lasA*, *lasB*, *pqsH* and *lasI* (Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997)(and this study) can be also controlled via RhIR, and are activated late in absence of LasR. Although unique binding sites have been identified in several LasR-regulated promoters (Schuster *et al.*, 2004b), it has not been possible to define a single consensus binding site sequence in the promoter of QS-controlled genes, or to differentiate LasR- vs RhIR-specific promoters (Anderson *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999; Whiteley & Greenberg, 2001). Our data suggest that RhIR can efficiently recognize LasR boxes, since RhIR is able to activate some LasR-specific genes.

Finally, considering the fact that 3-oxo-C₁₂-HSL production kinetics begin to decrease early and thus do not correlate with *lasB* transcriptional activation or PQS production, and that LasR is inactive in absence of its autoinducer (Schuster *et al.*, 2004b), it is reasonable that other regulators are able to take over and/or supplement LasR in order to express these factors. Since C₄-HSL, unlike 3-oxo-C₁₂-HSL, accumulates during growth, it appears that RhIR is active and functional for a much longer period than LasR. RhIR is thus a good candidate to itself activate some LasR-regulated factors.

Importantly, it is noteworthy that we have repeated most experiments reported here with different *P. aeruginosa* PAO1 strains, leading to the same conclusions. We have therefore no indication our results are restricted to the PA14 strain.

1.2.5.5 Spontaneous emergence of lasR mutants during infections would preclude targeting the las system for antivirulence QS therapy

Understanding why supposedly non-virulent mutants might be selected in infected patients is an intriguing question. After quantification of pyocyanin, rhamnolipids and protease activities, our results show that during late stationary phase, a *lasR* mutant is able to produce at least as much of these virulence factors as the wild type. This might contribute to explain the occurrence of such mutants among clinical isolates (Heurlier et al. 2006).

Over the last few years, research has been carried out to identify drugs targeting QS to prevent virulence instead of bacterial survival, in order to circumvent the risks of resistance observed with antibiotic treatments (Hentzer et al., 2002; Hentzer et al., 2003; Smith et al., 2003; Wu et al., 2004). Until now, these therapies have mostly targeted the las system, because blocking the activity of LasR is thought to inactivate all P. aeruginosa QS. However, we have shown here that the rhl system not only is expressed late in a lasR mutant but also that RhlR is able to overcome the las system when the latter is deficient by activating specific LasR-controlled functions. This suggests that P. aeruginosa possesses abilities to circumvent the deficiency of one of its QS systems by allowing the other to take over. This should be taken into account in the light of new therapies directed against QS in P. aeruginosa. In this respect, targeting other levels of the QS circuitry, such as PQS/4-quinolone signaling (Lesic et al., 2007) or the RhlR/C4-HSL system, might represent interesting alternatives.

1.3 Résultats annexes à l'article

En complément aux résultats publiés dans Microbiology, plusieurs expériences ont été réalisées.

1.3.1 Certains gènes dépendants de LasR ne sont jamais activés par RhIR

Dans l'article, j'ai montré que de nombreux facteurs de virulence et moléculessignal peuvent être activés par RhIR dans un mutant *lasR*. Ce n'est toutefois pas une règle sans exception. Le suivi de la production de HQNO, une molécule de la famille des HAQ similaire au HHQ et au PQS, et dont la production dépend des enzymes PqsABCD ainsi que de PqsL, a montré que celle-ci n'est pas augmentée par la surexpression de *rhlR* chez le mutant *lasR*⁻. Ces résultats suggèrent que certains facteurs nécessaires à la production de HQNO ne sont peut-être pas exprimés dans ces conditions. Il serait intéressant de suivre directement la transcription du gène *pqsL* chez le mutant *lasR*⁻ en présence ou en absence de *rhlR* par qRT-PCR.

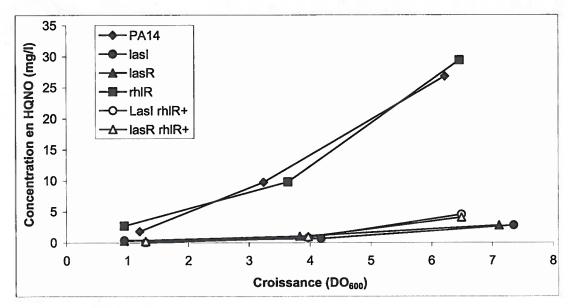


Figure 1-11. Analyse LC-MS de la production de HQNO dans plusieurs mutants exprimant ou non rhlR.

1.3.2 Confirmation des résultats obtenus avec la souche PA14 dans plusieurs autres souches PAO1

La majorité des expériences publiées avec la bactérie *P. aeruginosa* se font sur la souche PAO1. Cependant, la souche PA14 (Rahme *et al.*, 1995), plus apparentée aux souches cliniques et environnementales identifiées (Wiehlmann *et al.*, 2007), commence à prendre une part plus importante au niveau des publications scientifiques. Puisque la souche PAO1 reste la plus répandue, il est nécessaire de confirmer que les résultats obtenus avec PA14 peuvent s'appliquer à celle-ci. La Figure 1-12 montre que le mutant *lasR* de PAO1 exprimant *rhlR* réagit identiquement à celui de PA14. En effet, les

productions de pyocyanine (Figure 1-12B), de 3-oxo- C_{12} -HSL (Figure 1-12A) et de PQS (Figure 1-12C) sont presque totalement inhibées en absence de rhlR, et l'expression de ce dernier rétablit leur production. Quant à la production de HQNO, celle-ci n'est pas non plus influencée par la présence de rhlR chez le mutant lasR de PAO1 (Figure 1-12D).

La Figure 1-12A montre que la production de 3-oxo-C₁₂-HSL chez les mutants lasR⁻ (pUCPSKrhlR) est deux fois moindre dans PAO1 que chez PA14. Ceci peut s'expliquer entre autres par la différence de densité cellulaire obtenue entre les deux souches. Le mutant lasR⁻ de PAO1 surexprimant rhlR montre une déficience de croissance et/ou génère beaucoup d'agglomérats, tandis que chez PA14 la croissance n'est pas du tout affectée (Figure 1-12E).

Ces résultats démontrent que les observations faites chez PA14 sont également applicables pour la souche PAO1.

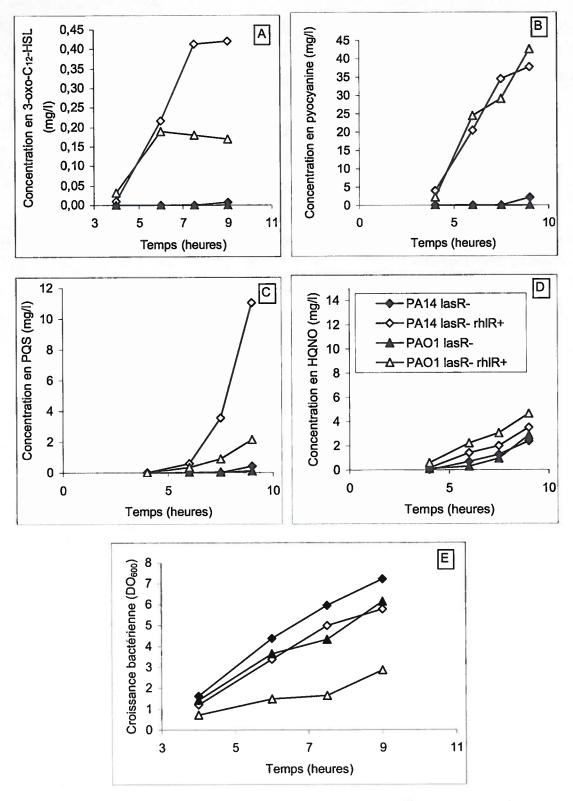


Figure 1-12. Analyse LC-MS des AHL et des HAQ chez les mutants $lasR^*$ chez PA14 et PA01. rhlR+= gène rhlR exprimé de manière constitutive au moyen du vecteur pUCPSKrhlR.

1.3.3 L'effet de RhIR sur les cibles de LasR n'est pas visible lorsque ce dernier est présent

Puisque RhlR a démontré sa capacité à activer PqsH et LasI pour générer du PQS et du 3-oxo-C₁₂-HSL, cette production est-elle augmentée si on surexprime RhlR chez la souche sauvage? Est-elle affectée dans un mutant rhlR? Le suivi des molécules-signal et de la pyocyanine a été réalisé chez la souche PA14 exprimant ou non rhlR de manière constitutive (pUCPSKrhlR), ainsi que chez le mutant rhlR. La Figure 1-13 montre que la surexpression de rhlR chez la souche sauvage n'induit pas une augmentation de 3-oxo-C₁₂-HSL ou de PQS. RhlR semble toutefois avoir un effet sur PqsH, puisqu'un mutant rhlR produit davantage de HHQ (dû à l'effet inhibiteur de RhlR sur l'opéron pqsABCDE) mais moins de PQS que la souche sauvage. Cet effet disparaît lorsque RhlR est fonctionnel, sans distinction entre son expression native ou constitutive. RhlR ne semble donc pas capable d'induire l'expression des gènes dépendants de LasR lorsque ce dernier est présent dans la cellule. Ceci pourrait être dû au fait que l'affinité entre LasR et ces promoteurs est beaucoup plus importante que celle avec RhIR. Enfin, la plus forte croissance du mutant rhlR, comparativement aux autres mutants, est en partie due à l'absence de pyocyanine, et donc à l'absence de stress oxydatif que ce composé génère. La différence de densité cellulaire des cultures de rhlR ne s'observe pas systématiquement, et doit dépendre d'autres paramètres environnementaux non connus. Il est également possible que la quantité de bactéries rhlR inoculées pour l'expérience ait été légèrement supérieure à celle des autres souches.

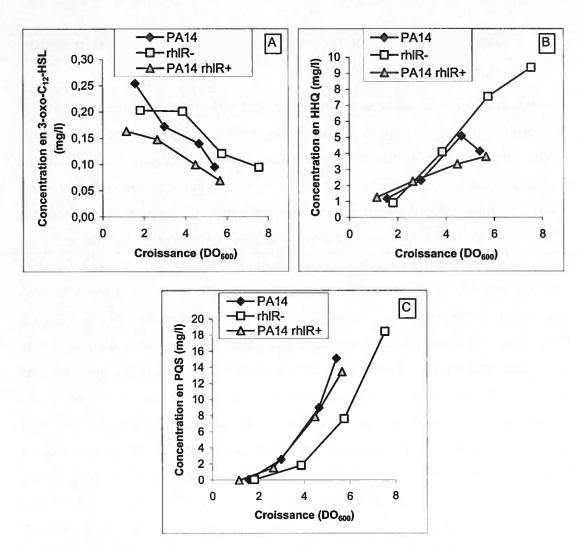


Figure 1-13. Analyse LC-MS de la production de molécules-signal en présence (pUCPSKrhlR) ou en absence de RhIR.

Cinétiques de production de : (A) 3-oxo-C₁₂-HSL, (B) HHQ et (C) PQS en fonction de la croissance bactérienne.

1.3.4 Confirmation de l'interaction directe entre RhIR et le promoteur de *lasI*

1.3.4.1 Description de la méthode de retard de mobilité sur gel d'électrophorèse (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Afin de confirmer que RhlR parvient à se fixer sur le promoteur de *las1*, j'ai utilisé la technique de retard de mobilité sur gel d'électrophorèse (EMSA, Electrophoretic

Mobility Shift Assay). Cette technique permet d'observer une migration d'ADN différente lorsque l'ADN d'intérêt est complexé avec une protéine. Le promoteur du gène *las1* est amplifié par PCR et marqué à la digoxygénine selon les méthodes routinières présentées à la section 3.2.11, page 191, en utilisant les amorces plas-295F et plas-295R (voir Appendice C). Les dNTP utilisés sont ceux provenant du PCR DIG Labeling Mix (Roche 11 585 550 910) contenant de la digoxygénine-11-dUTP.

Le protocole de retard sur gel suivi est celui fourni par le fournisseur (Roche, numéro de catalogue 03353591910), et adapté aux conditions expérimentales du projet. En bref, les souches DH5α portant le vecteur pUCPSKrhlR ou pUCPSK sont cultivées dans 50 ml de milieu TSB jusqu'à obtention d'une DO600 de 3. Le culot est centrifugé durant 10 min. à 10 000 x g et lavé dans le tampon de liaison (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 650 mM KCl, 10% glycérol) à trois reprises. Les cellules sont resuspendues dans 1 ml de ce même tampon. Les cellules sont brisées par un processus de gel-dégel au cours duquel des bactéries sont soumises à une alternance de température allant de 50°C à plusieurs dizaines de degrés sous 0°C (bain de glace sèche/éthanol, environ -78° C). La solution est ensuite centrifugée 10 min. à 16 500 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. La concentration en protéines du surnageant est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant les réactifs et les protocoles du fournisseur (Bio-rad Protein Assay). L'hybridation entre l'extrait protéique contenant RhlR et la région promotrice de lasI se fait à température ambiante durant 25 min. en présence de 5 mg/l de C4-HSL afin de garantir la dimérisation et l'activation de RhlR. Plusieurs concentrations de protéines sont testées. L'extrait protéique exposé au promoteur de lasI marqué a migré sur gel de 6% de polyacrylamide. Après transfert sur une membrane de nylon positivement chargée, la présence de la digoxygénine associée au promoteur de las l est révélée au moyen d'anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline et de l'un des substrats chémiluminescents de cette dernière, le CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro (1,2dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.13,7]decan)-4-yl) phenyl phosphate), selon le protocole établi par le fournisseur (Roche).

1.3.4.2 Résultats obtenus

J'ai suivi la migration sur gel d'électrophorèse du promoteur de *las1* en présence ou non de *rhlR* et de son auto-inducteur, le C₄-HSL. La Figure 1-14 montre que la migration du promoteur est retardée lorsqu'un extrait protéique contenant *rhlR* est ajouté. On observe en effet l'apparition d'une bande supplémentaire lors de l'ajout de l'extrait protéique, qui s'intensifie avec une concentration croissante de ce dernier. Ceci démontre une hybridation entre le promoteur de *las1* et une des protéines présentes dans l'extrait. Étant donné que toutes ces protéines proviennent d'*E. coli* hormis *rhlR* que j'ai exprimé en *trans*, je peux supposer que c'est bien RhlR qui se fixe au promoteur. Néanmoins, plusieurs contrôles devraient être effectués afin de valider l'expérience, en la répétant avec un extrait protéique ne contenant pas RhlR ou en présence d'un autre promoteur connu pour ne pas se lier à RhlR. Ceci confirmerait que l'effet observé n'est pas dû à une association non spécifique. Si le temps n'avait pas été un facteur limitant, il aurait été élégant de purifier la protéine RhlR et de l'utiliser seule pour vérifier son association avec le promoteur du gène *las1*.

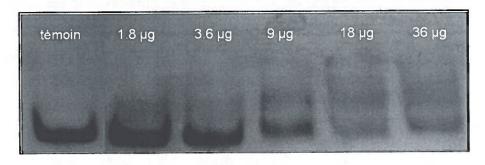


Figure 1-14. Retard de la migration du promoteur de *lasI* en présence de *rhIR*. Témoin : migration du promoteur de *lasI* marqué à la digoxygénine et révélé au CSPD en absence de protéines. Les autres puits sont nommés en fonction de la quantité de protéines dans l'échantillon qui a migré.

1.4 Conclusion du chapitre

P. aeruginosa est l'une des bactéries dont le QS est le plus étudié et le mieux caractérisé. Bien que de nombreuses questions sur les différents facteurs endogènes et exogènes influençant celui-ci sont encore fort d'actualité, les deux systèmes majeurs de

cette régulation, soit les systèmes LasIR et RhIIR ainsi que leur lien hiérarchique semblaient être bien établis. Néanmoins, plusieurs paradoxes restaient alors inexplicables. C'était entre autres le cas des mutants *lasR* spontanés qui surproduisent des facteurs de virulence et que l'on retrouve très fréquemment dans les poumons des gens atteints de fibrose kystique. Le travail que j'ai publié en 2009 et que j'ai présenté dans ce chapitre permet de concilier les connaissances précédentes avec les paradoxes observés. En effet, *P. aeruginosa* possède de nombreux mécanismes alternatifs qui permettent à l'un de ces systèmes de prendre le relais lorsque le second est déficient. Il témoigne une fois de plus que *P. aeruginosa* est une bactérie extrêmement versatile, capable de s'adapter tant aux changements environnementaux qu'aux variations génotypiques auxquelles elle doit parfois faire face.

En conclusion, ces travaux démontrent la grande complexité des interactions entre les différents systèmes de QS chez *P. aeruginosa*. Le plus grand impact de ces recherches au niveau médical est la démonstration que l'inactivation du système Las n'est pas suffisante pour inactiver la totalité du QS et l'expression de tous les facteurs de virulence chez cette bactérie. Dans la perspective d'un traitement anti-infectieux, il sera donc primordial de cibler les deux systèmes de QS afin de garantir une inhibition maximale de l'expression de la virulence chez *P. aeruginosa*.

2 <u>Le système de quorum sensing PQS-MvfR :</u> biosynthèse et fonction des 4-hydroxy-2alkylquinolines

2.1 Introduction

2.1.1 Découverte du système MvfR-PQS

Lors de l'étude des systèmes Las et Rhl du quorum sensing chez P. aeruginosa, une nouvelle molécule-signal a été mise en évidence dans une souche ne produisant pas d'AHL (Pesci et al., 1999). Celle-ci permet d'activer des gènes connus pour être régulés par le quorum sensing. Cette molécule, identifiée comme étant du 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, a été nommée PQS pour Pseudomonas Quinolone signal (Pesci et al., 1999). En parallèle, lors d'un criblage à la recherche de gènes impliqués dans la virulence de P. aeruginosa (Rahme et al., 1997), un nouveau régulateur transcriptionnel a été mis à jour, puis caractérisé et nommé MvfR pour Multiple Virulence Factor Regulator (Cao et al., 2001; Déziel et al., 2005) ou PqsR (Gallagher et al., 2002). En absence de ce régulateur, le PQS n'est pas produit, et un bon nombre de gènes de virulence ne sont pas exprimés. Une analyse transcriptomique comparant l'expression génique d'un mutant mvfR- avec celle de la souche sauvage PA14 révèle son importante implication dans la régulation des gènes contrôlés par le quorum sensing (Déziel et al., 2005).

A la suite d'un autre criblage à la recherche de mutants déficients dans la production de la pyocyanine, l'opéron pqsABCDE a été identifié. Les gènes qu'il contient codent des enzymes responsable de la biosynthèse du PQS (Gallagher et al., 2002). MvfR active l'opéron pqsABCDE ainsi que l'opéron phnAB (Cao et al., 2001; Déziel et al.,

2005; Gallagher et al., 2002; McGrath et al., 2004). Les gènes *phnAB* contribuent à la production d'acide anthranilique (Essar *et al.*, 1990a), tandis que les gènes *pqsABCD* interviennent dans la transformation de l'acide anthranilique en 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ), dont le PQS fait partie (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004). Quant au gène *pqsE*, il n'intervient pas dans la biosynthèse des HAQ (Déziel *et al.*, 2004) mais est nécessaire pour activer le régulon MvfR (Déziel *et al.*, 2005; Gallagher *et al.*, 2002).

2.1.2 Le système MvfR-PQS est un nouveau système de quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Le système MvfR-PQS peut être défini comme un réel système de *quorum sensing*, dont le fonctionnement est similaire aux systèmes Las et Rhl. Tout comme ces derniers, ce système est composé d'un régulateur transcriptionnel (MvfR), activant d'une part l'expression de ses propres ligands (le HHQ, et indirectement le PQS) et d'autre part l'expression de nombreux gènes liés à la virulence chez *P. aeruginosa*. L'activation de la biosynthèse de ses propres ligands permet la mise en place d'une boucle de rétroaction positive semblable à celles observées dans les systèmes LasR – LasI – 3-oxo-C₁₂-HSL et RhlR – RhlI – C₄-HSL.

Ce nouveau système de *quorum sensing* est interdépendant des systèmes Las et Rhl. En effet, la biosynthèse du PQS nécessite la présence du régulateur LasR (Pesci *et al.*, 1999), qui contrôle la transcription du gène *pqsH* (Gallagher *et al.*, 2002) responsable de la transformation du HHQ en PQS, ainsi que la transcription de *mvfR* (Wade *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006b). Quant au système Rhl, il diminue la transcription de l'opéron *pqsABCDE* (McGrath *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006b) en se fixant sur des séquences reconnues par RhlR au niveau du promoteur de ces gènes.

Le PQS affecte également les systèmes Las et Rhl. Du PQS exogène active la transcription du système Rhl en augmentant la transcription de *rhll* (McKnight *et al.*, 2000), bien qu'en absence de HAQ et donc de PQS, aucun effet sur les AHL ni sur les régulateurs LasR et RhlR n'ait été observé (Déziel *et al.*, 2005). Étant donné le chevauchement partiel entre les gènes contrôlés par MvfR et ceux régulés par le système

Rhl (Déziel et al., 2005), il est probable que l'activation du régulon de MvfR passe en partie par le système Rhl (Diggle et al., 2003; McKnight et al., 2000; Pesci et al., 1999), bien que le système MvfR-PQS n'intervienne pas sur la transcription de rhlR directement (Cao et al., 2001; Déziel et al., 2005). Tout comme pour les AHL des systèmes Las et Rhl, l'ajout de PQS ou de HHQ ne permet pas d'activer le régulon MvfR en absence de MvfR. Ceci est également vrai en absence de PqsE, ce qui confirme le rôle primordial de cette protéine dans l'expression du régulon de MvfR (Déziel et al., 2005).

Près de 141 gènes ont une transcription affectée dans un mutant mvfR, selon des données transcriptomiques (Déziel et al., 2005). Parmi ceux-ci, 55% représentent des gènes connus pour être régulés par le quorum sensing via les AHL. Sur les 141 gènes affectés, 121 présentent une augmentation de transcription, ce qui confère à MvfR un rôle d'activateur. Les gènes dépendant du quorum sensing les plus affectés sont les gènes de l'opéron pqsABCDE et les gènes phnAB, ainsi que les gènes codant pour une pompe à efflux de type RND (Résistance / Nodulation / Division cellulaire) (Aendekerk et al., 2002). L'expression transcriptionnelle de l'opéron impliqué dans la biosynthèse de la pyocyanine, phzAIBICIDIEIFIGI, est également maintenue à son niveau basal. De nombreux gènes nécessaires à la production de plusieurs toxines et facteurs de virulence (hcnAB, chiC, lecA, lecB codant pour la biosynthèse de l'acide cyanhydrique, pour une chitinase et pour deux lectines, respectivement) ont une expression moindre chez le mutant mvfR (Déziel et al., 2005).

Une étude ultérieure a démontré l'activation directe par MvfR de l'opéron pqsABCDE. Le régulateur reconnaît une séquence spécifique (TTCGGACTCCGAA) appelée boîte LysR, centrée à -45 paires de bases du codon d'initiation de la transcription du gène pqsA (Xiao et al., 2006b). À ce jour, aucun autre gène identifié dans les données transcriptomiques n'est régulé par MvfR de manière directe. L'essentiel du régulon de MvfR est donc indirect. MvfR active l'opéron pqsABCDE, permettant ainsi l'expression de PqsE et de la voie de régulation menant à l'activation du reste du régulon. Cette affirmation a été confirmée par les données transcriptomiques du mutant pqsE, très semblables à celles de mvfR hormis pour la régulation de l'opéron pqsABCDE lui-même (Hazan et al., 2010).

2.1.3 L'opéron *pqsABCDE* est responsable de la production de nombreuses molécules

2.1.3.1 L'opéron pqsABCDE est nécessaire pour la production des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ)

Plus d'une cinquantaine de molécules appartenant à la famille des HAQ, produites par la souche sauvage PA14 et absentes dans un mutant $mvfR^-$ ont été identifiées par LC-MS en 2004 (Déziel et al., 2004; Lépine et al., 2004). Ces HAQ sont regroupés en 5 séries, basées sur la présence d'un hydrogène ou d'un groupement hydroxyle en position 3, d'un groupement N-oxyde en remplacement de l'azote du noyau quinoline, et de la présence d'une insaturation sur leur chaîne alkyle (Figure 2-1). Au sein d'une même série, la longueur de la chaîne aliphatique peut varier de 5 à 11 carbones, selon le nombre de groupements acétate assimilés (Lépine et al., 2004). Les HAQ les plus abondants en général sont ceux qui possèdent une chaîne aliphatique saturée de 7 ou 9 carbones.

Figure 2-1. Structure des différentes séries de HAQ présentes chez *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2004).

Parmi ces molécules, toutes ne sont pas directement produites par l'action des enzymes codées par l'opéron. La production des HAQ possédant un groupement *N*-oxyde (séries 4 et 5 de la Figure 2-1) nécessite la présence de l'enzyme PqsL pour être synthétisés, bien que le substrat de cette enzyme ne soit pas encore connu (Lépine *et al.*, 2004). Les HAQ présentant un groupement hydroxyle en position 3 (série 3 de la Figure

2-1) tel que le PQS sont les produits directs de l'enzyme PqsH, responsable de l'ajout de ce groupement hydroxyle (Gallagher et al., 2002).

2.1.3.2 L'opéron pqsABCDE produit également du 2,4-dihydroxyquinoline

Lors de l'étude de la biosynthèse des HAQ, la recherche de dérivés intermédiaires a mené à l'étude comparative des molécules présentes chez la souche sauvage et chez les mutants de l'opéron *pqsABCDE*. Durant ces travaux, une nouvelle molécule, nommée 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ) a été identifiée. Les données les plus récentes ainsi que les travaux effectués sur cette molécule sont présentés à l'Appendice I ainsi que dans la publication (Lépine *et al.*, 2007), présentée dans l'Appendice E.

2.1.4 Voie de biosynthèse des HAQ

2.1.4.1 Les HAQ sont issus de la condensation de l'acide anthranilique avec une chaîne aliphatique, synthétisée elle-même à partir d'acétate

Calfee et al. (2001) ont démontré qu'un ajout d'acide anthranilique radioactif dans une culture de *P. aeruginosa* induisait la production de PQS radioactif. Par la suite, Déziel et al. (2004) ont étendu l'expérience et ont rapporté un marquage systématique de tous les HAQ en présence d'acide anthranilique marqué. L'acide anthranilique est donc le précurseur anabolique de tous les HAQ connus à ce jour. De plus, Bredenbruch et al. (2005) ont montré que le carbone 2 du PQS est issu de l'acétate, appuyant le fait que le PQS résulte de la condensation d'une chaîne aliphatique avec une molécule d'acide anthranilique.

2.1.4.2 Caractéristiques des gènes intervenant dans la biosynthèse des HAQ

2.1.4.2.1 La production d'acide anthranilique dépend de nombreux gènes

Tel que mentionné plus haut, les HAQ sont issus de la transformation d'acide anthranilique par l'action des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD. Le substrat initial nécessaire à la production des HAQ est donc l'acide anthranilique. Il existe de nombreuses protéines similaires à des anthranilate synthases au sein du génome bactérien

de *P. aeruginosa*. Deux de celles-ci seulement sont réellement affectées à ce rôle (Essar et al., 1990a; Essar et al., 1990b). Les gènes codant pour celles-ci sont appelés trpEG (Crawford, 1975) et phnAB (Essar et al., 1990a) (Figure 2-2). Finalement, une troisième voie enzymatique permet de produire de l'acide anthranilique à partir des produits de dégradation du tryptophane (Evans, 1963) et nécessite l'action des gènes kynABC pour le réaliser (Kurnasov et al., 2003) (Figure 2-2B).

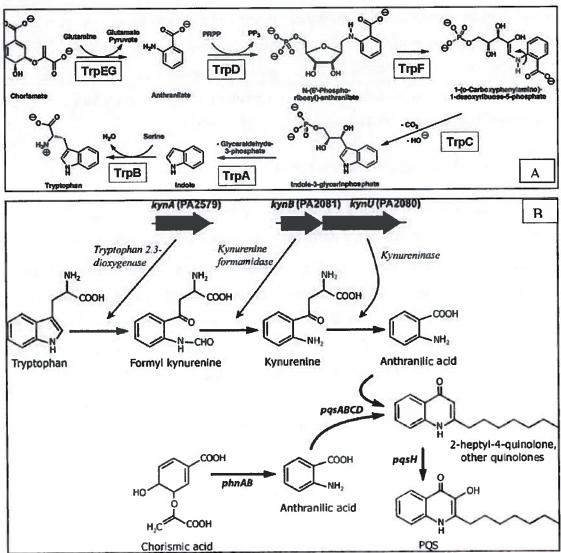


Figure 2-2. Voie de biosynthèse du tryptophane (A) et de l'acide anthranilique (B) (Farrow & Pesci, 2007).

2.1.4.2.1.1 Les gènes trpE et trpG codent une anthranilate synthase impliquée dans la biosynthèse du tryptophane

En 1990, deux paires de gènes ont été identifiées comme des anthranilate synthases chez P. aeruginosa. Une seule de ces deux paires est réellement impliquée dans la biosynthèse du tryptophane, et les gènes ont été nommés trpE et trpG, codant respectivement pour la sous-unité α et β de l'anthranilate synthase (Figure 2-2). En effet, une mutation dans ces gènes mène à l'abolition de la production de tryptophane, et seul un ajout exogène de tryptophane permet la croissance de ces mutants en milieu pauvre en ammonium (Essar et al., 1990b).

2.1.4.2.1.2 Les gènes phnA et phnB codent une anthranilate synthase

D'abord erronément identifiés comme des gènes impliqués dans la biosynthèse du tryptophane (Crawford et al., 1986), les gènes phnA et phnB codent respectivement la sous-unité α et β d'une seconde anthranilate synthase. Ces gènes sont adjacents sur le génome de P. aeruginosa, et se chevauchent sur 23 paires de base (Essar et al., 1990a). Une mutation dans ces gènes a mené à une diminution drastique de la production de pyocyanine (la phénazine bleue produite par P. aeruginosa; ceci explique le nom des gènes), tandis que les mutants ne requièrent pas l'ajout de tryptophane pour croître dans un milieu faible en ammonium (Essar et al., 1990a). Cette observation démontre que PhnA et PhnB n'interviennent pas dans la biosynthèse du tryptophane.

Les gènes *phnA* et *phnB* sont les gènes situés directement entre l'opéron *pqsABCDE*, et le gène *mvfR* (Figure 2-3), suggérant un lien avec le système MvfR-PQS. Cet opéron, distinct de celui des gènes *pqsABCDE*, est positivement régulé par MvfR (Cao *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2004; Déziel *et al.*, 2005). Une mutation dans ces gènes induit une diminution de production de PQS (Gallagher *et al.*, 2002), ce qui démontre le rôle de PhnA et PhnB dans la production du précurseur des HAQ.

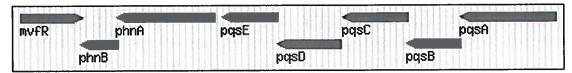


Figure 2-3. Arrangement génomique de la région de l'opéron pqsABCDE, de mvfR et de phnAB (www.pseudomonas.com).

Bien que *P. aeruginosa* possède deux anthranilate synthases, il est maintenant évident que celles-ci possèdent des propriétés spécifiques et interviennent dans des voies métaboliques différentes.

2.1.4.2.1.3 Les gènes kynA, kynB et kynU codent des enzymes impliquées dans la dégradation du tryptophane en acide anthranilique

Outre via l'activité enzymatique de ses deux anthranilate synthases, *P. aeruginosa* est également capable de générer de l'acide anthranilique à partir de la dégradation enzymatique du tryptophane par la voie de la kynurénine. En effet, par l'action des enzymes KynA, KynB et KynU, le tryptophane est dégradé en kynurénine puis en acide anthranilique (Farrow & Pesci, 2007; Kurnasov *et al.*, 2003) (Figure 2-2). Si au départ l'anthranilate synthase PhnAB a été considérée comme fournisseur principal de l'acide anthranilique pour la production des HAQ, de nouvelles évidences ont montré que la voie de la kynurénine est également une source importante de précurseur pour les HAQ (Farrow & Pesci, 2007). En effet, un ajout de tryptophane marqué mène à la production de PQS marqué et ce processus est aboli dans une souche dont la voie de la kynurénine a été bloquée. Les mutants *kynA* et *kynU* produisent peu ou pas de PQS (détectable par chromatographie en couche mince) dans un milieu riche en tryptophane (Farrow & Pesci, 2007), ce qui suggère que la voie de la kynurénine est la voie principale de production d'acide anthranilique dans ces conditions.

Tel que représenté dans la Figure 2-2, il existe donc deux voies métaboliques distinctes, sources de l'approvisionnement en acide anthranilique utilisable pour la biosynthèse des HAQ. Une étude suggère que la voie de synthèse de l'acide anthranilique par l'anthranilate PhnAB serait davantage utilisée en milieu minimal lorsque la concentration en tryptophane est faible, tandis que la voie de la kynurénine fournirait l'acide anthranilique nécessaire à la production de HAQ en milieu riche (Farrow & Pesci, 2007). Ceci expliquerait la raison pour laquelle un mutant kynA ou kynU ne produit plus

de PQS malgré la présence de PhnAB en milieu riche, et pourquoi un mutant *phnAB*⁻ n'en produit pas en milieu pauvre malgré la présence de la voie de la kynurénine.

2.1.4.2.1.4 Les gènes antABC dégradent l'acide anthranilique en catéchol

Les gènes antA, antB et antC codent une anthranilate dioxygénase. Celle-ci transforme l'acide anthranilique en catéchol chez Acinetobacter sp. ADP1 (Bundy et al., 1998). Des homologues de ces 3 gènes ont été identifiés chez P. aeruginosa, à proximité d'un régulateur putatif antR (Urata et al., 2004). Les gènes antABC et antR de P. aeruginosa appartiennent aux régulons de MvfR et de RhlR. RhlR associé à son auto-inducteur active leur transcription, probablement via AntR, tandis que MvfR les réprime (Oglesby et al., 2008; Schuster et al., 2003).

2.1.4.2.2 PqsA, PqsB, PqsC et PqsD transforment l'acide anthranilique en HAQ

2.1.4.2.2.1 PqsA est une acyl-coenzyme A ligase

Le processus théorique de formation des HAQ est la condensation de l'acide anthranilique et d'un acide 3-hydroxy-alcanoïque. Afin de rendre cette réaction possible, l'un ou l'autre de ces deux précurseurs doit être activé, par exemple au moyen d'une coenzyme A (Cornforth & James, 1956; Ritter & Luckner, 1971). En analysant les fonctions prédites des gènes de l'opéron pqsABCDE, il s'avère que le produit du gène pqsA (PA0996 dans PAO1, PA14_51430 dans PA14) est homologue à une variété d'acyl coenzyme A (acyl CoA) ligases. Par exemple, il présente 48% de similitude avec une CoA ligase de Rhodopseudomonas palustris. L'hypothèse d'une activation par PqsA a donc été étudiée. Et en effet, en présence d'acide anthranilique, d'ATP et de CoA, l'enzyme purifiée a catalysé la formation d'anthranoyl CoA (Coleman et al., 2008) (Figure 2-4).

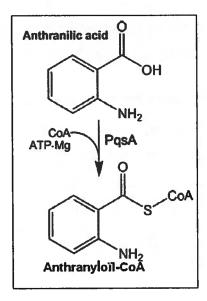


Figure 2-4. Transformation de l'acide anthranilique en anthranoyl-CoA catalysée par l'enzyme PqsA (Zhang et al., 2008).

2.1.4.2.2.2 PqsD est une acétyl-CoA ACP transacétylase nécessaire à la formation du HHQ

PqsD est une protéine de 337 acides aminés, de 36 kDa sous forme de monomère, ou de dimère de 72 kDa en solution. Son rôle dans la biosynthèse des HAQ n'est pas défini. Sa présence est cependant absolument requise pour permettre la production de ces molécules. Elle présente des homologies avec l'enzyme FabH, une enzyme de condensation, et possède les résidus Cys-His-Asn du site actif caractéristique de cette famille d'enzymes. Les enzymes de condensation jouent un rôle central dans la biosynthèse des acides gras. Elles sont responsables de l'élongation de la chaîne aliphatique par l'ajout de deux carbones (White *et al.*, 2005). Ces enzymes catalysent la condensation de Claisen pour former un lien carbone-carbone, en passant par un intermédiaire dans lequel la chaîne aliphatique est associée à l'enzyme (Heath & Rock, 2002). L'acyl-enzyme est formée par le transfert de la chaîne aliphatique à partir d'un acyl-CoA ou d'un acyl-ACP sur le résidu cystéine du site actif de l'enzyme via un lien thioester. Ensuite, l'acyl-ACP est décarboxylé, formant ainsi un carbanion, qui vient attaquer l'intermédiaire acyl-enzyme pour former le produit 3-céto-acyl-ACP.

Il existe des exemples d'enzymes de type FabH impliquées dans la biosynthèse d'autres composés que les acides gras. Les synthases de polykétides, tant bactériennes

que végétales, sont toutes des enzymes de type FabH (Austin & Noel, 2003). Leur particularité est qu'elles utilisent les esters-CoA exclusivement et catalysent des réactions supplémentaires à la condensation, telles que des cyclisations (Ferrer *et al.*, 1999). PqsD possède des analogies tant avec les enzymes FabH qu'avec les synthases de polykétides (PKS), puisqu'il parvient à utiliser l'ACP comme substrat similairement à FabH, mais qu'il pourrait cataboliser une réaction de cyclisation additionnelle comme le font les PKS. Le site actif de PqsD, plus large que celui de FabH, ainsi qu'une possibilité théorique de changement de conformation pourrait faciliter l'utilisation d'un substrat plus gros que le malonyl, tel qu'un β-céto-décanoate, nécessaire à la formation des HAQ (Bera *et al.*, 2009).

2.1.4.2.2.3 PqsB et PqsC ont des homologies avec des synthases de protéines betacéto-acyl-acyl-carrier

Aucune étude ne s'est encore penchée sur la fonction enzymatique des enzymes PqsB et PqsC. Selon leur séquence protéique, elles ont des homologies avec des synthases de protéines acyl-carrier (ACP). Elles sont prédites pour être des enzymes de condensation, mais les résidus du site actif impliqués dans les réactions de condensation ne sont pas tous présents. PqsC ne possède pas le résidu Asn, et PqsB ne possède aucun des trois résidus Cys-His-Asn. Néanmoins, leur région N-terminale présente les domaines typiques de la superfamille des enzymes de condensation de type FabH (Zhang et al., 2008).

Étant donné leur rôle essentiel pour la biosynthèse des HAQ, il est probable que ces enzymes soient impliquées dans l'activation ou le transport de l'acide gras et sa condensation avec l'acide anthranilique. La production de HHQ implique la condensation de l'anthranoyl-CoA avec un β-céto-décanoate associé par un lien thioester à un acyl-ACP ou un CoA (Bredenbruch *et al.*, 2005). En principe, cette réaction, analogue à celle observée pour la formation du DHQ, peut être catalysée par PqsD, PqsB ou PqsC (Figure 2-5).

Figure 2-5. Schéma hypothétique de la voie de biosynthèse du HHQ et du PQS (Bera et al., 2009).

2.1.4.2.3 PqsH transforme le HHQ en PQS

PqsH est prédite pour être une monoxygénase flavine-adénine-dinucléotide (FAD)-dépendante, un type d'enzyme qui utilise le NAD(P)H et l'oxygène pour catalyser l'hydroxylation de composés aromatiques (Massey, 1995). Elle est requise pour la biosynthèse du PQS (Gallagher et al., 2002) et sa transcription est régulée par LasR (Diggle et al., 2003; Gallagher et al., 2002; Whiteley et al., 1999). Elle serait responsable de l'hydroxylation du HHQ pour former du PQS (Figure 2-6).

Le logiciel de prédiction psortb (http://www.psort.org/psortb/index.html), le plus fiable actuellement, ne parvient à prédire aucune localisation pour cette protéine, bien que certains autres programmes lui aient prédit un emplacement périplasmique. La localisation périplasmique de PqsH permettrait de convertir le HHQ extracellulaire en PQS intracellulaire, ce qui garantirait un meilleur échange de signaux entre les individus d'une population. Ainsi, seul le HHQ extérieur provenant des autres individus serait transformé en PQS et activerait le régulon MvfR (Déziel et al., 2004).

$$\begin{array}{c|c} OH & O \\ \hline \\ PqsH & OH \\ \hline \\ N & C_7H_{15} \\ \hline \\ HHQ & PQS \\ \end{array}$$

Figure 2-6. Production de PQS à partir du HHQ par l'action de PqsH. Adapté de Bera et al. (2009).

2.1.4.2.4 PqsL est impliqué dans la biosynthèse du HQNO

Le gène pqsL est prédit pour coder une protéine de la famille des monoxygénases FAD-dépendantes (www.pseudomonas.com). Une mutation dans ce gène génère une

surproduction de HHQ et de PQS, menant à un phénotype d'autolyse et d'iridescence. L'augmentation de leur production suggérait un lien entre la fonction de PqsL et la production de HAQ (D'Argenio et al., 2002). Par la suite, Déziel et al. (2004) et Lépine et al. (2004) ont montré que PqsL est nécessaire pour la biosynthèse des HAQ N-oxydes (HQNO).

Le substrat de PqsL est encore inconnu. Le HHQ n'est pas un candidat, car un ajout de HHQ marqué ne génère pas de HQNO marqué (Déziel et al., 2004). Toutefois, la voie de biosynthèse du HQNO reste liée à celle du HHQ, puisque toutes deux nécessitent l'action des mêmes enzymes, et que l'absence de HQNO génère par conséquent une augmentation de production des autres HAQ.

Figure 2-7. Biosynthèse du HQNO. Adapté de Déziel et al. (2004).

2.1.4.2.5 MvfR régule la transcription de l'opéron pqsABCDE

La protéine MvfR, appelée également PqsR, est un régulateur de type LysR (Cao et al., 2001). La plupart de ces régulateurs ont environ 300 acides aminés. Leur extrémité N-terminale contient un domaine de liaison à l'ADN et leur extrémité C-terminale code un domaine de liaison à un ligand inducteur permettant d'activer le régulateur (Schell, 1993; Tyrrell et al., 1997). La production de ces ligands est en général sous le contrôle direct du régulateur qu'ils activent. C'est le cas du HHQ, produit par les enzymes PqsABCD, dont l'expression des gènes est directement contrôlée par MvfR. C'est également le cas du PQS, qui est un dérivé direct du HHQ. Néanmoins, le gène codant

pour l'enzyme réalisant la transformation du HHQ en PQS, pqsH, n'est pas régulé par MvfR (Déziel et al., 2005). MvfR ne contrôle donc qu'indirectement la production de PQS.

Le PQS augmente l'affinité du domaine de liaison à l'ADN de MvfR pour le promoteur de pqsA-E (Wade et al., 2005), ce qui suggère qu'il pourrait être le ligand de ce régulateur. Néanmoins en absence de PQS, dans un mutant pqsH, l'activation de la transcription de pqsA-E par MvfR a toujours lieu. Cette observation a mené à la découverte que le HHQ est également un ligand de MvfR (Xiao et al., 2006a). La liaison physique du HHQ et du PQS sur le site d'attachement à un ligand de MvfR a été confirmée. Cette association induit un changement de conformation de MvfR nécessaire à sa fixation au promoteur des gènes qu'il régule. In vitro, le PQS possède une affinité beaucoup plus importante que le HHQ pour le site de fixation sur MvfR. Une concentration cent fois plus faible de PQS par rapport au HHQ induit une activation semblable de MvfR (Xiao et al., 2006a). Par contre, à une concentration proche de la concentration physiologique de P. aeruginosa, le PQS est environ 2 à 3 fois plus efficace pour activer MvfR (Xiao et al., 2006a). Cette différence suggère que la fixation du HHQ ou du PQS induirait un changement de conformation différent en fonction du ligand fixé, ce qui modifierait l'affinité de MvfR pour les séquences promotrices auxquelles il se fixe.

Généralement, les régulateurs de type LysR contrôlent négativement leur propre transcription (Schell, 1993). MvfR, présent dans la fraction membranaire, possède la capacité d'être clivé entre les résidus 146 et 147 en phase stationnaire pour se retrouver en partie dans le milieu extracellulaire (Cao et al., 2001). Cette modification est induite par le surnageant de la souche sauvage PA14, mais n'a pas lieu en présence du surnageant d'un mutant mvfR. Le clivage dépend donc d'un facteur sous le contrôle de MvfR. Ce clivage rend MvfR inactif et incapable d'affecter la transcription des gènes qu'il régule, ce qui mène à une boucle de rétroaction négative. L'analyse de la séquence de MvfR montre un possible peptide signal de 24 acides aminés dans la portion N-terminale qui n'est pas impliqué dans le clivage mentionné précédemment (Cao et al., 2001). Par contre, depuis ces travaux publiés en 2001, aucune autre étude publiée ne s'est penchée sur ce phénomène de clivage particulier à MvfR.

2.1.5 Les HAQ ont de nombreuses fonctions biologiques

2.1.5.1 Les 4-hydroxyquinolines ont des propriétés antibactériennes

2.1.5.1.1 4-hydroxyquinolines synthétiques et naturelles

Le premier rôle attribué aux 4-hydroxyquinolines synthétiques est un rôle antibactérien, induisant entre autres la réponse SOS de réparation de l'ADN (Kaminsky & Meltzer, 1968; Markees et al., 1974; Phillips et al., 1987). L'acide nalidixique a, entre autres, été utilisé comme antibiotique pour traiter les infections du tractus urinaire pendant plusieurs années, mais l'apparition de microorganismes résistants a mené à diminuer son usage (Sarkozy, 2001). Par la suite, de nombreuses fluoroquinolones ont été utilisées dans le domaine vétérinaire, telles que l'amifloxacine, la ciprofloxacine, la danofloxacine, la difloxacine et la norfloxacine (Sarkozy, 2001).

P. aeruginosa produit naturellement des 4-hydroxyquinolines alkylées (appelées précédemment les composés pyo et actuellement les HAQ). Celles-ci ont un effet antibactérien contre d'autres microorganismes (Lacey et al., 1995; Wells, 1952). Cet effet disparaît toutefois lorsqu'on utilise des extraits des mutants pqsA ou mvfR, qui eux n'ont aucun effet antibactérien contre Staphylococcus aureus et Bacillus subtilis (Déziel et al., 2004). Il reste à noter que le PQS ne possède pas d'activité antibactérienne (Pesci et al., 1999). Quant au HHQ, bien qu'il ait été identifié comme substance antimicrobienne lors de sa découverte (Leisinger & Margraff, 1979; Wells, 1952), aucune activité antibiotique n'a été observée par la suite en présence de la molécule pure (Déziel et al., 2004).

2.1.5.1.2 Les HAQ N-oxydes inhibent la respiration bactérienne chez plusieurs espèces

Les HAQ N-oxydes dont le HQNO sont ceux possédant la plus forte activité inhibitrice envers de nombreuses bactéries à Gram positif (Lightbown & Jackson, 1956; Machan et al., 1992) mais également envers quelques-unes à Gram-négatif (Yoshikawa et al., 1999). Chez les bactéries à Gram-positif, le HQNO inhibe le transfert d'électrons nécessaire à la respiration cellulaire. Plus précisément, il capte l'électron transféré entre les deux hèmes constituant le cytochrome b et entre le cytochrome b et le centre fer-

soufre du complexe cytochrome bc₁, ce qui rompt la chaîne de transfert des électrons (Matsuno-Yagi & Hatefi, 1996; Trumpower, 1990a) (Figure 2-8).

Le cytochrome bc_1 est le mécanisme de respiration cellulaire le plus commun chez les procaryotes. On le retrouve chez les bactéries à Gram positif, à Gram négatif, chez celles utilisant l'azote, l'oxygène et le soufre comme accepteurs d'électrons, chez les bactéries photosynthétiques oxygéniques et anoxygéniques ainsi que chez les mitochondries des eucaryotes (Trumpower, 1990b).

L'effet du HQNO sur le cytochrome bc_1 n'explique pas la raison pour laquelle certaines souches bactériennes y sont sensibles et d'autres résistantes. Il se peut que certaines possèdent des voies alternatives au cytochrome bc_1 , ce qui limiterait l'effet toxique du HQNO. Le HQNO agit aussi sur d'autres enzymes telles que plusieurs cytochromes, des flavines (Kogut & Lightbown, 1962) ainsi que la NADH-quinone réductase (NQR) (Fadeeva et al., 2008). Cette enzyme est une pompe à sodium nécessaire à la respiration et à la production d'énergie de plusieurs espèces de Vibrio (Unemoto & Hayashi, 1993), de Klebsiella pneumoniae et d'Azotobacter vinelandii. Il est également possible que des organismes soient capables de devenir résistants au HQNO en le dégradant par exemple, ou en exprimant une « cytochrome bd quinole oxydase » résistante codée par les gènes cydAB dans plusieurs bactéries du genre Staphylococcus (Voggu et al., 2006).

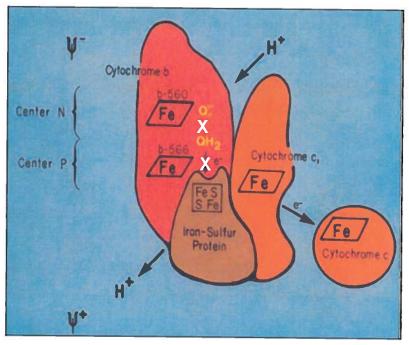


Figure 2-8. Inhibition de la chaîne respiratoire par le HQNO : blocage du cytochrome bc1 (Trumpower, 1990a).

Les croix blanches représentent les transferts d'électrons bloqués par le HQNO.

2.1.5.1.3 Le HQNO peut protéger certaines bactéries contre des antibiotiques

L'inhibition de la chaîne respiratoire par le HQNO exerce également une action protectrice pour certaines bactéries à Gram positif contre les antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Le mécanisme d'entrée de ces molécules dans la cellule dépend du transfert d'électrons établi pour la respiration cellulaire (Lightbown, 1954). Le HQNO, en bloquant la respiration de la bactérie *Staphylococcus aureus* (qui ne possède pas de cytochrome *bd* quinole oxydase résistante) (Voggu *et al.*, 2006), la pousse à se convertir à une croissance par fermentation (anaérobie). Cette modification est accompagnée par une diminution en production d'ATP. Cela ralentit la croissance cellulaire, induisant ainsi le phénotype variant de petites colonies (SCV-Small colony variants), résistantes aux aminoglycosides et persistant dans les infections chroniques (Biswas *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2006).

2.1.5.1.4 Les HAQ N-oxydes protègent P. aeruginosa du phénotype d'autolyse et iridescence

Enfin, bien qu'encore largement incompris, un mutant $pqsL^-$ possède un phénotype de forte autolyse et d'iridescence en milieu solide (D'Argenio et al., 2002). Ce phénotype s'observe également dans un mutant $lasR^-$ (D'Argenio et al., 2007). On ne sait pas si la cause de ce phénotype est due à l'absence de l'enzyme PqsL ou à l'absence de HQNO. Néanmoins, un ajout de HQNO fait disparaître le phénotype d'iridescence et d'autolyse sur une gélose (Dr. Luke Hoffman, communication personnelle), ce qui suggère que cette molécule est bien responsable de la protection de P. aeruginosa contre un stress encore inconnu. En culture liquide, le mutant $pqsL^-$ possède une croissance similaire à celle de la souche sauvage. Aucun agrégat n'est observable, ni aucun autre phénotype témoignant d'une lyse cellulaire précoce ou amplifiée.

Il est peu probable que l'autolyse en milieu solide soit d'origine bactériophagique, car aucune autolyse générée par près de 150 bactériophages testés sur *P. aeruginosa* ne présente l'aspect métallique typique des mutants autolytiques et iridescents (*metalic sheen*) (Zierdt, 1971). Quant à l'identité du matériel iridescent, il s'agit d'une forte concentration de HHQ (D'Argenio *et al.*, 2007; Zierdt, 1971). Bien que les deux phénotypes (autolyse et iridescence) aient toujours été associés, aucune piste ne permet de savoir s'ils le sont réellement, ou si l'un induit l'apparition de l'autre.

2.1.5.2 Les HAQ sont des molécules-signal

Le HHQ et le PQS ont clairement été identifiés comme molécules-signal (Déziel et al., 2004; Diggle et al., 2007). En effet, tous deux se fixent au régulateur transcriptionnel MvfR. Cette association mène à un changement conformationnel du régulateur, qui lui permet de se fixer sur les promoteurs qu'il contrôle (Xiao et al., 2006a). De plus, il a été proposé que le HHQ et le PQS établissent un système de communication intercellulaire, le HHQ exogène étant transformé au niveau de la membrane cellulaire en PQS pour conduire le signal au sein de la cellule (Déziel et al., 2005).

2.1.5.3 Les HAQ sont impliqués dans la virulence de P. aeruginosa

Le HHQ et le PQS sont les auto-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR. Le système MvfR-PQS est connu pour réguler de nombreux facteurs de virulence tels que la production d'élastase, de lectines, de rhamnolipides et de pyocyanine (Diggle *et al.*, 2003; Gallagher *et al.*, 2002; Pesci *et al.*, 1999). Ce système est requis pour l'expression de la virulence et la pathogénicité de *P. aeruginosa* dans de nombreux organismes tels que les nématodes (Gallagher & Manoil, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), les plantes (Rahme *et al.*, 1997) et les souris (Lau *et al.*, 2004). Le HHQ et le PQS sont également produits par *P. aeruginosa* dans les poumons des individus atteints de fibrose kystique ou chez les grands brûlés (Collier *et al.*, 2002; Machan *et al.*, 1992). Le PQS a également un effet sur la réponse immunitaire humaine (Hooi *et al.*, 2004).

2.1.5.4 Le PQS est impliqué dans la formation des microvésicules

Les microvésicules sont de petites structures sphériques qui émergent de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et qui peuvent fusionner avec les membranes d'une autre cellule (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Kadurugamuwa & Beveridge, 1997). Elles sont majoritairement constituées de phospholipides et de lipopolysaccharides. Chez *P. aeruginosa*, la majorité du PQS extracellulaire, peu soluble, est véhiculé dans, ou associé à, ces microvésicules (Mashburn & Whiteley, 2005).

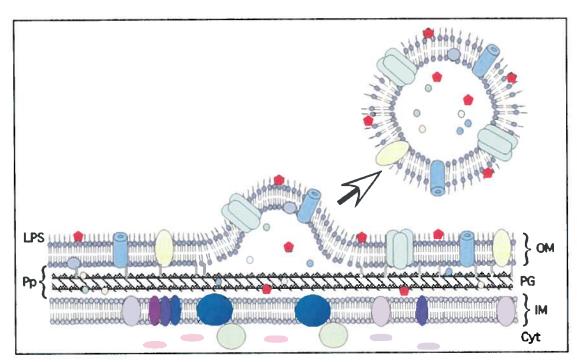


Figure 2-9. Formation et composition des microvésicules. Adapté de Kuehn & Kesty (2005) OM: membrane externe; IM: membrane interne; PG: peptidoglycan; Pp: périplasme LPS: lipopolysaccharides; Cyt: cytosol.

Le PQS serait nécessaire à la formation de ces microvésicules, indépendamment de son contexte d'activateur de MvfR (Mashburn & Whiteley, 2005). Le PQS interagit avec les lipopolysaccharides (LPS), constituant majeur de la membrane bilipidique externe. Le groupement hydroxyle du PQS est nécessaire à son association avec le groupement phosphate du lipide A (Mashburn-Warren *et al.*, 2008), lipide d'ancrage des LPS. La chaîne aliphatique du PQS interagit également avec le lipide A.

2.1.5.5 Le PQS intervient dans la balance d'oxydo-réduction

En fonction des conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les bactéries, il est important que le métabolisme cellulaire s'ajuste. En situation de stress, celles-ci doivent activer leurs mécanismes de survie, tandis qu'en situation de colonisation d'un milieu riche elles cherchent à éliminer leurs compétiteurs. En présence de PQS, les cellules deviennent plus sensibles aux stress oxydatifs et la fragmentation ainsi que la libération d'ADN en dehors de la bactérie sont augmentées (Haussler & Becker, 2008). Ces effets néfastes du PQS pourraient mener à la mort des bactéries peu

adaptées aux stress auxquels elles sont exposées. Par contre, l'induction d'un stress oxydatif et la libération d'ADN sont également des signaux d'alarme perçus par la bactérie et induisant chez elle les modifications métaboliques nécessaires à sa survie, telles qu'une meilleure tolérance aux rayonnements UV et une dégradation des espèces réactives à l'oxygène. Ainsi, le PQS, pro-oxydant, génèrerait un stress qui pourrait permettre aux cellules de s'adapter aux conditions environnementales difficiles en stimulant la production de facteurs anti-oxydants. Ceci se ferait au détriment des bactéries moins adaptables et au bénéfice des plus versatiles (Haussler & Becker, 2008).

2.1.5.6 Le PQS a un effet chélateur

Une étude transcriptomique a étudié l'effet de PQS exogène sur *P. aeruginosa*. De nombreux gènes impliqués dans l'acquisition du fer par les sidérophores (les gènes de biosynthèse et de régulation de la pyochéline *pchDCBA*, *pchF* ainsi que de son récepteur *fptA* et les gènes de biosynthèse de la pyoverdine *pvdA* et *pvdD*) et dans l'induction d'un stress oxydatif sont surexprimés par cet ajout (Bredenbruch *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés par une étude parallèle (Diggle *et al.*, 2007). L'effet d'un ajout de PQS sur la transcription de ces gènes pourrait se faire *via* le régulateur Fur, connu pour réprimer les gènes d'acquisition du fer lorsque celui-ci est abondant (Prince *et al.*, 1991), car de nombreux gènes de son régulon se retrouvent présents dans le transcriptome d'une souche exposée à un ajout de PQS (Bredenbruch *et al.*, 2006). Plusieurs autres études transcriptomiques montrent que le manque de fer et le stress oxydatif sont deux conditions liées, l'une induisant l'autre et vice versa (Chang *et al.*, 2005; Ochsner *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2004; Salunkhe *et al.*, 2005).

Un ajout de PQS diminue fortement la quantité de fer libre dans le milieu cellulaire à pH physiologique, comme le font les chélateurs. La formation d'un complexe PQS-Fe pour un ratio de 3 pour 1 a été détectée et confirme le lien entre l'ajout de PQS, la diminution de fer libre, et la réponse phénotypique à un manque de fer en présence de PQS (Bredenbruch et al., 2006; Diggle et al., 2007).

L'association entre le PQS et le fer ne permet pas une meilleure acquisition du fer par la bactérie, ce qui démontre que le PQS n'agit pas comme un sidérophore. Par contre, puisque le PQS se lie facilement aux membranes bactériennes, celui-ci pourrait permettre

de retenir le fer à proximité de la cellule jusqu'à ce qu'un sidérophore vienne fixer ce dernier pour être assimilé (Diggle et al., 2007).

Le PQS affecte des gènes dépendants du système Rhl via l'appauvrissement en fer du milieu, qui active ce système (Bredenbruch et al., 2006). Ce même mécanisme n'intervient toutefois pas dans le contrôle du régulon de MvfR par le PQS, qui agit sur ce régulateur directement et indépendamment de la concentration en fer libre dans le milieu (Diggle et al., 2007). Toutefois, il est possible que le complexe PQS-fer module l'activité de la molécule en la rendant moins active dans son rôle de ligand de MvfR (Hazan et al., 2010).

Le HHQ ne possède aucune activité chélatrice, bien que certains aient rapporté que le HNQ puisse en avoir une (Royt et al., 2001). Une autre étude a néanmoins montré que seules les di-hydroxyquinolines comme le PQS, et non les mono-hydroxyquinolines comme le HHQ ou le HNQ, pouvaient chélater le fer (Bredenbruch et al., 2006).

Il reste à mentionner que la production de PQS est fortement diminuée dans des conditions où le fer est abondant. Lorsque le fer n'est pas un facteur limitant, le régulateur Fur réprime l'expression de deux petits ARN régulateurs, prrF1 et prrF2 (Wilderman et al., 2004). Ces deux petits ARN régulateurs répriment les gènes antABC, ce qui limite la dégradation de l'acide anthranilique et augmente la disponibilité de ce substrat pour la production des HAQ et donc du PQS. En leur absence, l'acide anthranilique est davantage dégradé et le PQS est donc moins abondant (Oglesby et al., 2008). Dans le même sens, lorsque le fer devient manquant, le régulateur Fur active un autre régulateur, PvdS, qui vient activer la transcription de MvfR en se fixant sur une région IS (Iron Starvation) présente sur son promoteur, ce qui génère une plus forte production de HAQ (Ochsner et al., 2002).

2.1.6 Les HAQ sont produits par plusieurs genres bactériens

Les précurseurs des HAQ sont des molécules très communes. La chaîne aliphatique requise pour leur formation est un produit de la biosynthèse des acides gras, et l'acide anthranilique est nécessaire à la formation de certains acides aminés aromatiques. Ces deux précurseurs se retrouvent donc dans un très grand nombre de microorganismes. On

peut alors supposer que la production de HAQ puisse être réalisée par des microorganismes autres que *P. aeruginosa*. Bien que des homologues de chaque enzyme de l'opéron *pqsABCDE* impliquée dans la biosynthèse des HAQ soient présents dans d'autres espèces bactériennes, pour l'instant seules certaines espèces du genre *Burkholderia* sont connues pour posséder un opéron entier homologue à *pqsABCDE* (Diggle *et al.*, 2006b; Vial *et al.*, 2008), dont les espèces *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. oklahomensis* ainsi que *B. ambifaria*, cette dernière appartenant au complexe *cepacia*.

Intégrées auparavant erronément dans la famille des *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992), *Burkholderia* appartient au groupe des β-protéobactéries, retrouvées dans de nombreuses niches écologiques telles que le sol, les plantes, les rhizosphères, l'eau, les insectes, les champignons, les milieux hospitaliers et les humains (Coenye & Vandamme, 2003). Plusieurs espèces vivent en symbiose avec des plantes (Richardson *et al.*, 2002) tandis que d'autres, telles que les bactéries du complexe *cepacia*, se sont adaptées à un rôle de pathogène opportuniste et sont responsables d'infections respiratoires chez les individus souffrant de la fibrose kystique (Coenye *et al.*, 1999). Enfin, deux espèces, *B. mallei* et *B. pseudomallei*, sont de véritables pathogènes des humains et des animaux, responsables respectivement de la morve (Lehavi *et al.*, 2002; Whitlock *et al.*, 2007) et de la mélioïdose (Ip *et al.*, 1995; Perret, 1997). *B. thailandensis* est une proche parente de *B. pseudomallei* mais est considérée comme avirulente (Brett *et al.*, 1998).

2.1.6.1 Plusieurs espèces de Burkholderia produisent des HAQ méthylés, les HMAQ

L'homologie entre l'opéron trouvé dans les espèces de Burkholderia et l'opéron pqsABCDE a été confirmée par une complémentation d'un mutant pqsA et pqsE de P. aeruginosa avec l'expression de hhqA et hhqE de B. pseudomallei respectivement (Diggle et al., 2006b). Une analyse des composés sécrétés par B. pseudomallei a révélé la présence de HHQ et d'autres composés de la famille des HAQ, mais en des concentrations extrêmement faibles par rapport à P. aeruginosa. Cette production n'est pas détectée dans un mutant hhqA*, ce qui supporte son implication dans la biosynthèse des HAQ des espèces de Burkholderia (Diggle et al., 2006b).

Une étude plus poussée de l'opéron hhqABCDE a révélé que l'opéron présent dans les espèces de Burkholderia contient 2 gènes supplémentaires en aval de hhqE, et que le dernier était impliqué dans la méthylation des HAQ. En effet, la presque totalité des HAQ présents chez Burkholderia possèdent un groupement méthylé en position 3 et sont en fait des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ). L'opéron a alors été renommé hmqABCDEFG (Vial et al., 2008) (Figure 2-10). Une autre différence structurelle entre les HAQ et les HMAQ est la position de l'éventuelle insaturation sur la chaîne aliphatique. Alors qu'elle se situe en position 1' chez P. aeruginosa, elle se retrouve en position 2' dans le genre Burkholderia (Vial et al., 2008).

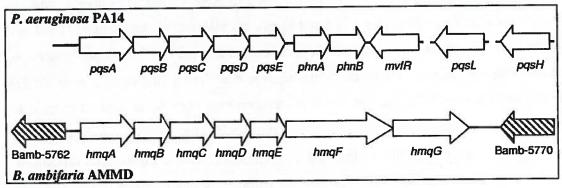


Figure 2-10. Comparaison de la région codant pour les enzymes de biosynthèse des HAQ et des HMAQ chez *P. aeruginosa* et *B. ambifaria* respectivement (Vial *et al.*, 2008).

Aucun homologue de pqsH n'a été identifié chez les espèces de Burkholderia possédant l'opéron hmqABCDEFG. Ceci expliquerait qu'aucun PQS n'a été détecté dans ces souches bactériennes (Diggle et al., 2006b). Par contre, un homologue de pqsL a été découvert chez B. thailandensis et B. pseudomallei et a été nommé hmqL. La présence de ce gène homologue corrobore la détection de HMAQ N-oxydes dans ces deux souches, et l'absence de ces composés dans B. ambifaria qui ne possède pas de hmqL (Vial et al., 2008).

Le rôle des HMAQ dans *Burkholderia* est encore incertain. A ce jour, aucun gène codant pour un régulateur homologue à *mvfR* n'a été identifié à proximité de l'opéron *hmqABCDEFG* (Vial *et al.*, 2008). Leurs propriétés de ligand éventuel ne peuvent donc pas être directement démontrées. Si les HAQ régulent l'expression de nombreux facteurs de virulence tels que les sidérophores et les exoprotéases chez *P. aeruginosa*, les HMAQ

ne partagent pas cette propriété chez Burkholderia (Diggle et al., 2006b). Par contre, les colonies des mutants $hmqA^-$ de B. pseudomallei possèdent un phénotype particulier, où l'aspect habituellement bombé et lisse des colonies est remplacé par une surface ridée. Selon des travaux de notre laboratoire, ce phénotype est toutefois inversé chez B. thailandensis, avec une apparence plus lisse pour le mutant $hmqA^-$ par rapport à la souche sauvage. L'activité élastase, connue pour être régulée négativement par le quorum sensing chez P. aeruginosa (Gambello & Iglewski, 1991; Toder et al., 1991) est augmentée dans un mutant $hmqA^-$ chez B. pseudomallei (Diggle et al., 2006b). De plus, bien que le système MvfR-PQS n'affecte pas la production d'AHL, les inducteurs des systèmes de quorum sensing Las et Rhl chez P. aeruginosa, les HMAQ affectent ces molécules chez B. ambifaria (Vial et al., 2008). Les mutants $hmqA^-$, déficients dans la production de HMAQ, ainsi que $hmqG^-$, déficient dans l'ajout du groupement méthyle en position 3' sur les HAQ, présentent une augmentation de ces auto-inducteurs, ce qui suggère un rôle des HMAQ dans le quorum sensing de Burkholderia et l'importance de la méthylation dans cette fonction (Vial et al., 2008).

2.1.7 Objectifs du projet

2.1.7.1 Objectifs spécifiques au chapitre

Tel que décrit dans l'introduction de ce document, l'objectif principal est de caractériser de manière approfondie les processus de communication intercellulaire chez *P. aeruginosa*. Alors que le premier chapitre de ma thèse se concentre sur les systèmes Las et Rhl, dans ce nouveau chapitre je m'intéresse exclusivement au système MvfR-PQS, et plus particulièrement aux molécules-signal qu'il synthétise et dont il dépend, les HAQ. Les objectifs spécifiques de ce chapitre sont :

- 1. L'identification de tous les gènes impliqués dans la biosynthèse des HAQ
- 2. La recherche d'inhibiteurs spécifiques de la voie de biosynthèse des HAQ
- 3. La caractérisation de la voie métabolique empruntée pour la biosynthèse de ces molécules
- 4. L'importance biologique de ces molécules ainsi que leur rôle spécifique au sein de la cellule.

2.1.7.2 Méthodologie et approche globale

Plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des HAQ ont déjà été préalablement identifiés, bien que leurs fonctions spécifiques n'étaient pas connues au moment où j'ai commencé ma thèse. Les gènes pqsA, pqsB, pqsC, pqsD, pqsH et pqsL sont tous nécessaires pour la production d'une ou de plusieurs molécules de la famille des HAQ. L'étude de la voie de biosynthèse des HAQ présentée ici est principalement basée sur la caractérisation de ces mutants. Dans un premier temps, je m'attarde principalement sur les voies de biosynthèse du HHQ et du HQNO par l'analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse des composés extracellulaires synthétisés dans les différents mutants, dans différentes conditions de culture. Par la suite, plusieurs observations m'ont portée à m'intéresser au rôle particulier de ces deux HAQ au sein de la cellule bactérienne.

En parallèle à ces travaux, plusieurs expériences portant sur des molécules affectant la production des HAQ ont été menées dans le cadre de collaborations avec d'autres laboratoires. Celles-ci étant directement impliquées dans l'étude du système MvfR-PQS, je les ai ajoutées dans ma thèse, bien qu'elles n'aient pas été approfondies autant que l'étude du HHQ ou du HQNO.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Souches, plasmides et conditions de culture

2.2.1.1 Conditions de culture

Les appendices B et D reprennent la liste des souches et des plasmides utilisés. Les cultures bactériennes sont généralement incubées dans du milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Fisher DF0370-17-3) à 37°C dans un tambour rotatif, avec une concentration appropriée d'antibiotiques au besoin (carbénicilline 300 mg/l, tétracycline 75 mg/l, triclosan 25 mg/l, chloramphénicol 15 mg/l).

Lors des tests en milieu minimal, le milieu M9 modifié a été utilisé (Na $_2$ HPO $_4$.7H $_2$ O 11,5 g/l, KH $_2$ PO $_4$ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH $_4$ Cl l g/l, FeCl $_2$ l $_\mu$ M, glutamate de sodium 5 g/l, MgSO $_4$ l M) (Sambrook & Russell, 2001).

Lors des tests en milieu anaérobie, le milieu de culture est préalablement bouilli durant une heure. On le barbotte ensuite à l'azote pour limiter au maximum la présence d'oxygène.

Sauf indication contraire, (i) les mutants pqsA et pqsC utilisés dans ce document sont les mutants non polaires et (ii) les mutants pqsA, pqsB, pqsC et pqsD polaires et non polaires sont cultivés en présence de 20 mg/l de PQS, afin d'activer la transcription de l'opéron. Les différents inhibiteurs testés sont ajoutés dans le milieu de culture dès le début de l'incubation. Les concentrations utilisées pour ces inhibiteurs sont celles qui ont un effet maximal sur la production des HAQ sans affecter la croissance bactérienne. Les précurseurs testés sont ajoutés après environ 3 heures d'incubation, lorsque la densité optique (DO₆₀₀) de la culture atteint 1,5. Les mesures de DO₆₀₀ ont été obtenues avec un spectrophotomètre Thermo Scientific NanoDropTM 1000. Si cela n'a pas été spécifié, les analyses et expériences ont été réalisées lorsque la culture bactérienne a atteint le milieu de la phase stationnaire, soit vers une DO₆₀₀ de 5.

Les plasmides sont intégrés dans les souches bactériennes de *P. aeruginosa* par électroporation en suivant le protocole de Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2006). Les plasmides sont intégrés dans les souches d'*E. coli* par choc thermique au CaCl₂: une culture d'*E. coli* en phase de croissance exponentielle (DO₆₀₀ de 0,5-1) est centrifugée à 7500 x g durant 1 min. Le culot des cellules est resuspendu dans 50 mM CaCl₂. La solution est centrifugée à nouveau puis conservée sur la glace durant 10 min. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu dans 100 µl de 50 mM CaCl₂. L'ADN est ensuite incubé en présence des cellules sur glace durant une heure. Les cellules sont alors soumises à un choc thermique à 42°C durant 30 à 40 sec. puis immédiatement replacées sur glace pour 2 min., avant d'être récupérées dans 1 ml de milieu de culture et incubées à 37° pour 1 heure. La sélection se fait sur gélose contenant les antibiotiques appropriés.

Les tests de co-cultures sont réalisés en inoculant une même quantité de bactéries des deux souches bactériennes à partir de précultures. Les tests en présence de surnageants sont réalisés comme suit : des cultures bactériennes sont incubées jusqu'en fin de phase logarithmique dans les conditions voulues. La culture est ensuite centrifugée à 10 000 x g pendant 10 min., le surnageant est passé sur un filtre de 0,22 µm, et gardé à 4°C jusqu'à son utilisation (24 heures maximum).

Lorsque des souches bactériennes sont inoculées dans des fractions aqueuses telles que des surnageants ou des fractions HPLC, un volume de TSB concentré deux fois est ajouté à un volume de surnageant ou de fraction afin d'obtenir suffisamment de nutriments pour une bonne croissance bactérienne.

2.2.1.2 Construction du plasmide pVD08

Le plasmide pDN19 (Figure 2-11) (Nunn et al., 1990) a été utilisé pour exprimer constitutivement le gène pqsL de PA14. Une séquence (localisée sur le génome de PA14 entre les nucléotides 835060 et 833685 (www.pseudomonas.com)) contenant le gène pqsL (situé sur le brin antisens entre les nucléotides 835038 et 833833) de P. aeruginosa pqsL-HindIII-F amorces été amplifiée avec les **PA14** (CCCAAGCTTGGAACGACACGGAGACTCAT) et pqsL-XbaI-R (GCTCTAGACAACTGGAAGTCAGCGTGAA). Cet amplicon a été digéré par les enzymes de restriction HindIII et XbaI, puis ligué dans le plasmide pDN19 préalablement digéré au moyen des mêmes enzymes. Le vecteur final est nommé pVD08 et a une taille de 9185 pb. La construction a été confirmée par une complémentation efficace du mutant $pqsL^{-}$.

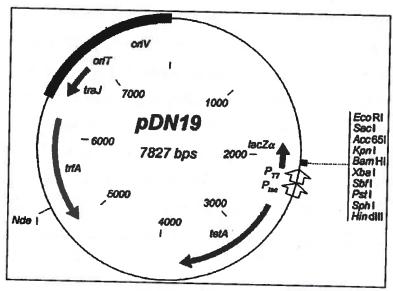


Figure 2-11. Représentation schématique du plasmide pDN19.

2.2.2 Extraction et concentration des HAQ

2.2.2.1 Extraction à l'acétate d'éthyle

La culture bactérienne est centrifugée 5 min à 12 500 x g. Le surnageant est récupéré et mélangé avec 1/3 de volume d'acétate d'éthyle. La fraction non polaire d'acétate d'éthyle est récupérée. Cette extraction est réalisée trois fois sur le surnageant. L'acétate d'éthyle récupéré est ensuite déshydraté au Na₂SO₄, puis évaporé à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif (Rotavapor® R, Buchi). Le résidu est resuspendu dans du méthanol jusqu'à dissolution complète. Les molécules non polaires sont alors concentrées environ 200 fois par rapport à la culture. La fraction polaire est passée à l'évaporateur rotatif durant 45 min. afin d'éliminer toute trace d'acétate d'éthyle et stérilisée sur un filtre de 0,22 μm (membrane de polyethersulfone (PES) hydrophile, Millex, Millipore).

2.2.2.2 Extraction à l'acétone

La fraction polaire d'un surnageant extrait à l'acétate d'éthyle est mélangée avec 50% d'acétone. La solution est saturée avec du NaCl jusqu'à obtention d'une turbidité. La solution est ensuite centrifugée à 16500 x g pendant 1 min., afin d'obtenir une séparation de phase. La phase supérieure d'acétone est récupérée, et la phase aqueuse est extraite deux autres fois. Les extraits à l'acétone sont regroupés, puis évaporés à sec. La phase aqueuse est éliminée car elle contient trop de sel.

2.2.3 Purification par fractionnement au HPLC

Les bactéries sont incubées dans les conditions favorisant la production des molécules d'intérêt. Dans le cas du précurseur polaire du HHQ, 20 mg/l de PQS ont été ajoutés à 50 ml de culture bactérienne, et celle-ci a été incubée à 37°C jusqu'en fin de phase logarithmique de croissance. Après centrifugation, le surnageant est extrait à l'acétate d'éthyle afin d'éliminer les composants non polaires. La fraction aqueuse est ensuite passée sur un filtre de 0,22 µm. Six ml du filtrat sont ensuite fractionnés par l'équipe du Dr François Lépine. La fractionation est effectuée par HPLC dans un gradient de méthanol, avec un débit de 4 ml par min. : 0-10 min. : 100% eau; 10-20 min. : gradient jusqu'à 100% méthanol; 20-25 min. : 100% méthanol; 25-35 min. : 100% eau. La colonne utilisée est une colonne Zorbax C8 (Phenomenex).

La fractionnation a généré cinq sous-fractions, qui ont par la suite été évaporées à sec, et redissoutes dans de l'eau stérile.

2.2.4 Séparation des molécules de taille inférieure à 3000 daltons

Une portion de 500 µl de surnageant ou d'une fraction d'intérêt sont centrifugés dans des microcons YM-3 (Millipore), tel que recommandé par le producteur, afin de séparer les molécules de taille inférieure à 3000 daltons. Le rétentat est également récupéré en inversant le sens du microcon et en centrifugeant une seconde fois.

2.2.5 Hydrolyse du précurseur extracellulaire polaire des HAQ

Dix µl d'hydrazine concentrée sont ajoutés à 40 µl du surnageant de culture bactérienne, respectivement. La solution est incubée à température ambiante pendant une nuit, puis évaporée à sec. Le matériel solide est ensuite dissous dans 40 µl d'une solution de méthanol 50% – eau 50%, puis injecté au LC-MS, en mode positif et en mode négatif.

Une solution de HCl 12 N a été ajoutée à raison de 26,8 µl dans 2 ml de surnageant (fraction polaire) pour obtenir un pH de 3,0 et une concentration finale de HCl de 0.1 N. L'hydrolyse a lieu à 85°C durant une heure. La fraction est ensuite neutralisée à pH 7,0 avec 60 µl de NaOH.

2.2.6 Production de HHQ in vitro

Le surnageant des cultures des mutants $pqsA_{np}^-$ et $pqsC_{np}$ est récupéré et passé sur filtre de 0,22 µm. La biomasse des cultures des mutants $pqsD_{np}^-$ et $pqsC_{np}$ est récupérée après une centrifugation de 3 min. à 10 000 x g d'une culture de 3 ml ayant atteint une DO₆₀₀ de 3. Le culot est resuspendu dans 1 ml du surnageant adéquat ($pqsA_{np}^-$ ou $pqsC_{np}$) filtré. La solution est ensuite soniquée 3 x 30 sec. (Sonics and Materials, Vibra Cell) avec une amplitude de 3% afin de briser les cellules, puis incubée à température ambiante. L'échantillonnage se fait ensuite aux temps 0, 45 et 90 min. : 300 µl sont mélangés avec 300 µl de méthanol contenant le standard interne (voir section 2.2.7), centrifugés, puis injectés au LC-MS.

2.2.7 Analyses par spectrométrie de masse

Pour la pyocyanine et les HAQ, 300 µl d'échantillon de culture sont récoltés, utilisés pour déterminer la densité cellulaire, puis mélangés avec 300 µl de méthanol contenant 20 mg/l de standard interne (5,6,7,8-tétradeutéro-PQS) pour une concentration finale de 10 mg/l. Après centrifugation, 20 µl du surnageant sont directement injectés dans le système de chromatographie en phase liquide (HPLC) Agilent HP1100 équipé d'une colonne C8 Luna en phase inverse 3x150 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Un gradient d'acétonitrile/eau contenant 1% d'acide acétique est utilisé comme phase mobile à un débit de 0,4 ml/min. Un spectromètre de masse triple quadrupole Quattro II (Waters, Mississauga, Ont., Canada) est utilisé pour la détection des ions pseudomoléculaires de 130 à 350 Da.

2.2.8 Détection des HAQ par fluorescence

Un ml de culture bactérienne est mélangé avec 300 µl d'acétate d'éthyle dans un microtube, puis centrifugé à 16 500 x g pendant 1 min. La solution est ensuite exposée aux ultraviolets à une longueur d'onde de 365 nm. Les solutions contenant des HAQ présentent une fluorescence visible à l'œil nu.

2.2.9 Quantification de la pyocyanine

Un ml de culture bactérienne est prélevé et mélangé avec 400 µl de chloroforme. Après une minute de centrifugation à vitesse maximale (16 500 x g), 300 µl de la phase inférieure (chloroforme) sont récupérés dans un nouveau microtube. Ensuite, la pyocyanine est extraite du chloroforme avec 15 µl de HCl 0,2 N et mesurée par absorbance à 520 nm. Ce protocole permet de concentrer la pyocyanine 50 x par rapport à la culture.

2.2.10 Mutagenèse aléatoire

Pour obtenir des transposants de la souche pqsL possédant mutation dans la voie de biosynthèse des HAQ, une conjugaison entre le mutant pqsL et une souche d'E. coli contenant le plasmide pIT2 (ISlacZ/hah (Jacobs et al., 2003)) a été réalisée. Le transposon ISlacZ (6,16 kpb) dérive de l'élément IS 50L du transposon Tn5 et génère une fusion traductionnelle entre la β-galactosidase (lacZ) et le gène dans lequel le transposon s'est inséré. Le promoteur de la néomycine phosphotransférase, dirigé vers l'extérieur du transposon, limite les effets polaires que pourrait générer l'insertion sur l'expression des gènes en aval. Les sites loxP permettent d'exciser le transposon au moyen de la recombinase Cre, ne laissant que 63 pb résiduelles et codant une étiquette de purification (hah).

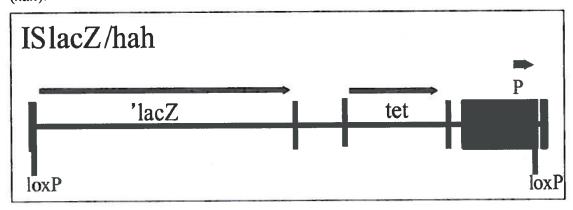


Figure 2-12. Schématisation du transposon ISlacZ/hah utilisé pour les mutagenèses aléatoires (Jacobs et al., 2003).

lacZ : gene de la β-galactosidase; tet : gène de résistance à la tétracycline; loxP : site de reconnaissance de la recombinase Cre; P : promoteur de la néomycine phosphotransférase.

Une gélose TSB inoculée avec 100 µl d'une préculture de pqsL est incubée à 42°C pendant 8 h. En parallèle, 100 µl d'une préculture d'E. coli pIT2 (ED047) sont inoculés

sur une gélose TSB + 75 mg/l tétracycline et incubés à 37°C pendant 8 h. La biomasse des deux géloses est ensuite récupérée et homogénéisée sur une gélose TSB sans antibiotique puis incubée 15 h à 37°C. La biomasse totale est finalement récupérée dans 4 ml de TSB contenant 20% glycérol, puis aliquotée par échantillon de 100 µl et conservée à -80°C. Le criblage de transposants s'effectue sur des géloses carrées 20 cm x 20 cm préséchées 1 h contenant 200 ml de gélose LB + 75 mg/l tétracycline (pour sélectionner les colonies possédant le transposon) et 15 mg/l chloramphénicol (pour éliminer la souche donneuse *E. coli*). Deux ml d'une dilution 10⁻³ d'un aliquot congelé de la conjugaison sont ensuite ensemencés par gélose pour obtenir environ 1000 colonies par plaque. Les géloses sont incubées à 37°C pendant 20 h puis à température ambiante pendant 1 journée. Les colonies ne présentant aucune iridescence par inspection visuelle sont mises en culture liquide en milieu TSB + 75 mg/l tétracycline dans des plaques de polystyrène (Ultident) de 96 puits pour la nuit. Ensuite, 5 µl de culture sont inoculés sur une nouvelle gélose TSB contenant les antibiotiques adéquats. Une fois le phénotype confirmé, la production de HHQ est quantifiée par LC-MS pour chacun des mutants.

Dans le cadre de la mutagenèse aléatoire en milieu acide, la souche receveuse est PA14. La souche donneuse est X7213 pIT2 (ED746), auxotrophe pour l'acide diamino pimélique (DAP). X7213 est cultivée sur milieu contenant 62,5 mg/l DAP et 75 mg/l tétracycline. Le milieu utilisé pour la conjugaison contient également du DAP. Le milieu de sélection pour le criblage est le LB supplémenté de 100 mM NaH₂PO₄ et ajusté à pH 6,5. L'antibiotique utilisé pour ce criblage est la tétracycline 75 mg/l. La dilution utilisée pour ce criblage et la sélection des mutants non-iridescents sont identiques à la mutagenèse avec *pqsL*⁻ (voir ci-dessus). L'incubation se fait à 37°C pendant 20 h.

2.2.11 Localisation de l'insertion du transposon par séquençage

Les cellules de 1,5 ml de préculture sont centrifugées à 12 500 x g, 1 min. Le culot est resuspendu dans du tampon phosphate salin (PBS): 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 31 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄, ajusté à pH 7,4 avec du HCl. Les cellules sont ainsi lavées deux fois au PBS. Elles sont ensuite lysées 10 min à 100°C, puis conservées 10 min. sur glace. La suspension est finalement centrifugée à 16 500 x g et le surnageant contenant l'ADN récupéré. L'amplification par réaction de polymérisation en chaîne

(PCR) est réalisée selon les paramètres mis au point par Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.*, 2003), disponibles dans les données supplémentaires liées à l'article référé.

La méthode utilisée est une amplification semi-dégénérée en deux temps. Lors de la première ronde, l'amplification est obtenue par PCR en utilisant une amorce (*lacZ*-211) qui s'hybride sur une région interne du transposon, et des amorces semi-dégénérées contenant une étiquette spécifique (CEKG2A, CEKG2B, CEKG2C) qui s'hybrident aléatoirement sur le génome bactérien (Figure 2-13). Lors de la seconde ronde, une amorce spécifique (*lacZ*-148) s'hybride sur une région du transposon amplifiée lors de la première ronde, tandis qu'une autre amorce spécifique (CEKG4) s'hybride sur la séquence de l'étiquette des amorces semi-dégénérées de la première ronde (Figure 2-13). L'amplicon ainsi généré est envoyé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill (http://www.gqinnovationcenter.com) pour le séquençage.

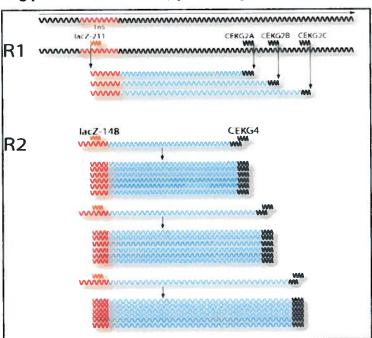


Figure 2-13. Schématisation de l'amplification de la région d'insertion du transposon (schéma de Julien Tremblay).

En rouge : séquence issue du transposon; bleu clair : séquence du génome située en aval de l'insertion transpositionnelle; R1 : première ronde d'amplification; R2 : seconde ronde d'amplification.

2.2.12 Extraction du transposon après mutagenèse

Les mutants ayant une insertion transpositionnelle sont utilisés comme souche receveuse. La souche donneuse est *E. coli* SM10-λpir (pCreI), contenant le gène de la

recombinase *creA*. La recombinase Cre est une topoisomérase de type I issue du bactériophage P1 qui catalyse la recombinaison spécifique de l'ADN entre deux sites *loxP* (Abremski & Hoess, 1984; Metzger & Feil, 1999), présents sur le transposon IS*lacZ/hah* et entre lesquels se trouvent le gène de la résistance à la tétracycline, ainsi que le gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase. Le protocole de conjugaison bactérienne utilisé est défini au point 2.2.10. La sélection des transconjugants se fait sur gélose TSB, en présence de chloramphénicol (15 mg/l) et de triclosan (25 mg/l) pour empêcher la croissance de la souche donneuse *E. coli*. Une centaine de colonies sont réinoculées sur de nouvelles géloses en présence et en absence de tétracycline 75 mg/l. Les colonies retenues sont celles qui ont perdu leur résistance à la tétracycline. Ces mutants possèdent alors une insertion résiduelle de 63 paires de bases codant pour un épitope influenzahémagglutinine et une étiquette de purification hexa-histidine (*hah*) (Bailey & Manoil, 2002).

2.2.13 Lyse cellulaire par sonication

Un ml de culture bactérienne est récolté et traité avec 4 mg de lysozyme pendant 30 min. à 37°C. Le lysozyme détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes la constituant. La suspension est ensuite soniquée 3 x 30 sec. avec une amplitude de 3%, puis centrifugée 2 min. à 16 500 x g et finalement filtrée sur 0,22 µm.

2.2.14 Analyse de la formation de biofilms

La méthode est basée sur le protocole publié par le Dr. Fletcher (Fletcher, 1977). Des cultures statiques (1 ml) sont réalisées en diluant 100 x une préculture dans le milieu minimal M9, dans des tubes en polystyrène. Les cultures sont incubées à 37°C durant 20 h. Les tubes sont ensuite rincés vigoureusement trois fois à l'eau milliQ. Du cristal violet (1,5 ml d'une solution de 1% dans l'eau) est ajouté dans les tubes. Les tubes sont incubés à température ambiante durant 15 min. puis sont à nouveau rincés vigoureusement. Un ml d'éthanol (95 %) est ajouté dans chaque tube afin de dissoudre le cristal violet ayant coloré le biofilm. La solution finale est analysée au spectrophotomètre à une absorbance de 600 nm. Chaque condition est effectuée en cinq réplicats.

2.3 Résultats

2.3.1 Cinétique de production des HAQ chez *P. aeruginosa* dans différentes conditions

2.3.1.1 Production des HAQ en milieu aérobie

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent les métabolites produits par P. aeruginosa nécessitant la présence de l'opéron pqsABCDE. Avant de présenter les différentes expériences, une cinétique de production des molécules étudiées a été réalisée en milieu aérobie avec la souche sauvage PA14, dans le but de fournir au lecteur les informations de base liées à la production naturelle de ces molécules, telles que le moment de leur production et les quantités obtenues (Figure 2-14). Il pourra ainsi s'y référer lors de la lecture du présent document. Quoique cette expérience-ci n'ait pas été effectuée avec des réplicats, ces données ont été confirmées en de multiples occasions.

Les niveaux de PQS et de HQNO s'accumulent en fonction du temps, tandis que le HHQ et le DHQ diminuent après avoir atteint un maximum à une DO₆₀₀ de 3-4. L'acide anthranilique, précurseur de toute cette famille de métabolites, reste relativement stable et peu abondant au fil de la croissance bactérienne. Ces métabolites ne sont pas produits avant la phase logarithmique de croissance, lorsque les gènes impliqués dans leur biosynthèse (mvfR, pqsA, pqsB, pqsC, pqsD, pqsH, pqsL) sont activés par le quorum sensing, lié à la densité cellulaire. Ils sont donc produits en même temps que les autres facteurs de virulence de la bactérie, également sous le contrôle du quorum sensing. Le DHQ et le HQNO sont les premiers métabolites détectés dans la culture bactérienne.

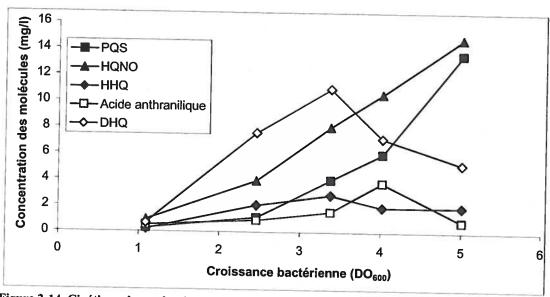


Figure 2-14. Cinétique de production des métabolites de l'opéron pqsABCDE chez P. aeruginosa.

2.3.1.2 Production des HAQ en présence de nitrates

Étant donné que les HAQ sont impliqués dans la virulence bactérienne, je me suis intéressée à étudier leur production dans un milieu se rapprochant des conditions retrouvées dans les poumons des personnes atteintes de fibrose kystique. Les avis divergent quant à savoir si le milieu de colonisation de *P. aeruginosa* dans les poumons des individus atteints de fibrose kystique est davantage aérobie ou anaérobie. Puisque les HAQ et le système MvfR-PQS sont impliqués dans la virulence, il est nécessaire d'en connaître l'expression dans les deux conditions mentionnées.

La production de HAQ a donc été quantifiée en milieu anaérobie, c.-à-d. en conditions dénitrifiantes. La Figure 2-15 montre que celle-ci est inférieure à celle retrouvée en milieu aérobie, mais pourrait s'expliquer par le fait que la densité cellulaire obtenue est nettement inférieure à celle observée en présence d'oxygène. Il est également intéressant de constater que le HHQ est la molécule la plus abondante en milieu anaérobie, ce qui suggère que PqsL et PqsH ont une activité moindre dans ces conditions.

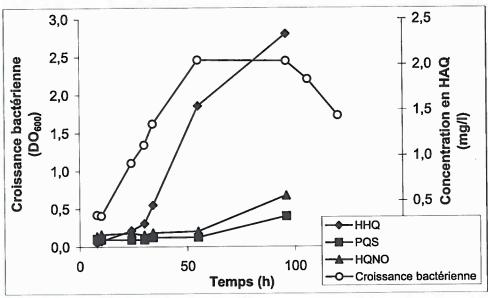


Figure 2-15. Croissance bactérienne (symbole blanc) et production des HAQ (symboles noirs) en milieu anaérobie chez *P. aeruginosa* PA14.

Puisque plusieurs de ces métabolites sont impliqués dans l'expression de nombreux facteurs de virulence, l'étude de leur biosynthèse devient intéressante, afin d'analyser les possibilités de bloquer leur production et ainsi diminuer la pathogénicité de P. aeruginosa.

Maintenant que les cinétiques de production des différentes molécules dont il est question dans ce chapitre ont été présentées, je peux reprendre plusieurs de celles-ci et approfondir l'étude de leur voie de synthèse.

2.3.2 Étude des inhibiteurs de la synthèse des HAQ

2.3.2.1 Inhibiteurs d'origine naturelle

L'une des raisons pour lesquelles il est intéressant d'étudier les HAQ est le fait que ces molécules permettent aux bactéries d'exprimer leurs facteurs de virulence. La recherche de molécules capables d'inhiber leur biosynthèse pourrait donc bloquer l'expression de la virulence chez *P. aeruginosa*. J'ai réalisé certaines expériences pour un projet de criblage de très nombreux inhibiteurs potentiels des HAQ en collaboration avec le Dr. François Lépine et le laboratoire de la Dre Laurence Rahme (Harvard Medical School).

De nombreuses molécules ont donc été testées afin de vérifier si elles bloquent la synthèse des HAQ. Ces études peuvent être faites de différentes manières. La méthode la plus rigoureuse est d'analyser le surnageant des cultures exposées à un inhibiteur potentiel par HPLC-MS et de quantifier la production de HAQ en absence et en présence de l'inhibiteur. Toutefois, cette méthode requiert l'analyse d'un grand nombre d'échantillons par LC-MS, ce qui est long et coûteux. Il existe une manière plus indirecte pour sélectionner d'éventuels inhibiteurs. Celle-ci se base sur le suivi de l'expression des facteurs de virulence contrôlés par le système MvfR-PQS. En absence de HAQ, ces facteurs seront peu ou pas exprimés. Or certains facteurs sont très facilement observables et ne nécessitent pas l'usage du LC-MS pour leur quantification. C'est le cas de la pyocyanine, qui colore de manière caractéristique le milieu de culture des bactéries qui la produisent. Avant d'analyser un trop grand nombre d'échantillons au LC-MS, j'ai réalisé un pré-test de suivi de la pyocyanine chez P. aeruginosa en présence de nombreuses molécules. Si l'inhibiteur potentiel affecte négativement la production des HAQ, le système MvfR-PQS ne pourra pas être pleinement activé, ce qui réduira la production de cette phénazine.

Les HAQ étant obtenus à partir d'acide anthranilique et d'un acide gras, j'ai utilisé des produits semblables à ces deux molécules pour tester leur potentiel inhibiteur. Des dérivés homologues à l'acide anthranilique, tels que le skatol (100 mg/l), le 4-hydroxyquinoline (100 mg/l) et l'indole (100 mg/l), ainsi que des dérivés d'acides gras tels que l'acide 2-octynoïque (1,6 mM), et l'acide 2-bromo-octanoïque (1,6 mM) (voir Appendice A) ont été rajoutés dans des cultures de la souche sauvage PA14. Toutes ces cultures ont présenté une déficience importante dans la production de pyocyanine. Afin de vérifier si cette déficience est bien due à l'inactivation du système MvfR-PQS, le même test a été réalisé chez la souche exprimant constitutivement *pqsE*, et qui ne nécessite donc plus la présence des HAQ pour activer le régulon de MvfR. La production de pyocyanine a été restaurée dans toutes les cultures, ce qui confirme que ces différents composés inhibent bien la biosynthèse des HAQ.

Le N-formyl-2-amino-acétophénone, le 2-amino-acétophénone (2-AA), l'indole – acide acétique et le tryptophane ont également été testés mais n'ont pas affecté la production de pyocyanine.

2.3.2.2 4-CABA et 6-FABA sont des inhibiteurs efficaces de la voie de synthèse des HAQ

Plusieurs molécules ont été synthétisées dans le laboratoire du Dr François Lépine afin d'en évaluer le potentiel inhibiteur sur les HAQ. L'un des mécanismes par lesquels une molécule est capable de bloquer la biosynthèse d'un composé est de se substituer au substrat naturel au niveau du site catalytique de l'enzyme qui le transforme. Ainsi, un inhibiteur est souvent une molécule relativement similaire au substrat naturel de l'enzyme qu'il inhibe, afin de pouvoir être reconnu comme tel par cette dernière. En ajoutant une substitution chlorée ou fluorée à l'acide anthranilique, précurseur des HAQ, ce nouvel inhibiteur peut être reconnu par PqsA, B, C ou D. Les atomes halogènes pourraient empêcher la formation d'un groupement carbonyle activé tel qu'un ester CoA, ce qui préviendrait la formation du second noyau aromatique des HAQ. Parmi les composés halogénés testés, l'acide 2-amino-4-chloro-benzoïque (4-CABA à 1,5 mM) et l'acide 2-amino-6-fluoro-benzoïque (6-FABA, à 3 mM) (voir structure en Appendice A) sont ceux qui ont induit la plus grande inhibition de production de pyocyanine chez la souche sauvage PA14, due à l'inactivation du système MvfR-PQS en absence de HAQ (Figure 2-16A).

D'autres composés halogénés tels que le 3-fluoro-N-acétométhylaniline, le 7-fluoro-HHQ, le 7-fluoro-PQS, le 5-fluoro-HHQ et le 5-fluoro-PQS n'ont montré aucune diminution de la production de pyocyanine, et ont donc été abandonnés. Un autre dérivé non halogéné de l'acide anthranilique, l'anthranoïl anthranilate a également été testé, mais n'a pas inhibé la production de la pyocyanine.

A présent que les pré-tests au moyen de la pyocyanine ont révélé l'efficacité des inhibiteurs 4-CABA et 6-FABA, j'ai quantifié par HPLC-MS le PQS produit en présence et en absence de ceux-ci dans une culture de la souche sauvage PA14 après 9 heures d'incubation. Les résultats (Figure 2-16B) montrent que la production de PQS est dramatiquement affectée par la présence de ces inhibiteurs.

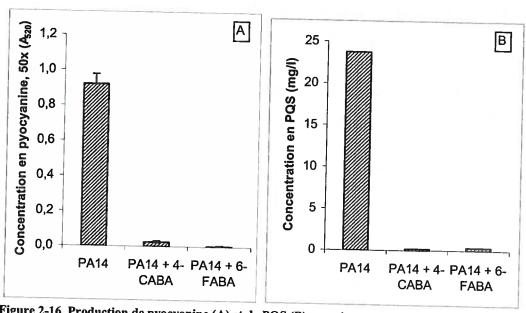


Figure 2-16. Production de pyocyanine (A) et de PQS (B) en présence de 4-CABA (1,5 mM) et 6-FABA (3 mM) chez la souche PA14 cultivée en TSB pendant 9h à 37°C.

2.3.2.3 Le 4-CABA n'agit pas seulement en bloquant l'enzyme PqsA

A la suite de ces résultats, l'étude des inhibiteurs des HAQ a été approfondie par le laboratoire de la Dre Laurence G. Rahme et a fait l'objet d'un article exhaustif résumant les données les plus pertinentes sur le sujet (Lesic et al., 2007). Dans cet article, des expériences ont été réalisées afin d'identifier l'enzyme ciblée par les inhibiteurs. Étant donné que ce sont des analogues à l'acide anthranilique, l'hypothèse proposée est qu'ils sont reconnus par PqsA spécifiquement. En effet, la fonction hypothétique de PqsA est d'activer l'acide anthranilique en le fonctionnalisant avec un coenzyme A (CoA), comme ce fut publié par la suite (Coleman et al., 2008). Tel que démontré par des tests de compétition avec de l'acide anthranilique exogène, le 6-FABA et le 4-CABA bloquent en effet PqsA de manière réversible (Lesic et al., 2007).

Nous avons voulu nous assurer que ces molécules ne ciblent qu'uniquement PqsA et n'interfèrent pas sur d'autres voies enzymatiques au sein de la cellule. Afin de vérifier si le 4-CABA inhibe la production de pyocyanine uniquement *via* l'inactivation de la biosynthèse des HAQ et donc du système MvfR-PQS, j'ai utilisé un mutant *pqsA* non polaire complémenté avec un ajout de PQS. Dans cette souche, il y a donc présence des enzymes PqsB, PqsC, PqsD et PqsE et suffisamment de PQS pour activer le système

MvfR-PQS, comme en témoigne la production de pyocyanine obtenue. Si le 4-CABA ne fonctionne que *via* le blocage de PqsA, un ajout de cet inhibiteur chez le mutant ne devrait pas affecter la pyocyanine. Les résultats que j'ai obtenus montrent pourtant que la production de pyocyanine est tout autant affectée dans ces conditions, et n'est donc pas restaurée par un ajout de PQS (Figure 2-17). Le 4-CABA n'agit donc pas uniquement *via* l'enzyme PqsA, ni *via* l'inhibition de production de HAQ puisque son effet ne peut être contrecarré par l'ajout de PQS dans le milieu.

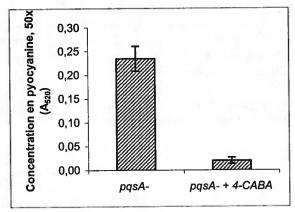


Figure 2-17 Production de pyocyanine en présence 1 mM de 4-CABA dans un mutant $pqsA^-$ non polaire complémenté avec 10 mg/l de PQS.

2.3.2.4 Inhibiteurs spécifiques des enzymes PqsB et/ou PqsC

Lors des différents tests d'inhibition de production des HAQ, j'ai obtenu des résultats importants avec le 2-bromo-N-(3-fluorophényl) acétamide (voir structure en Appendice A). Lorsqu'une culture de PA14 est incubée pendant 8 h avec différentes concentrations de cette molécule, j'obtiens une très nette inhibition des HAQ corrélée avec une nette augmentation de la production de DHQ (Figure 2-18). Cet inhibiteur bloque donc spécifiquement les enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ qui ne servent pas à produire du DHQ. Ce sont donc les enzymes PqsB et/ou PqsC qui sont spécifiquement bloquées par cet acétamide. Ces travaux sont présentement approfondis par le laboratoire de la Dre Rahme.

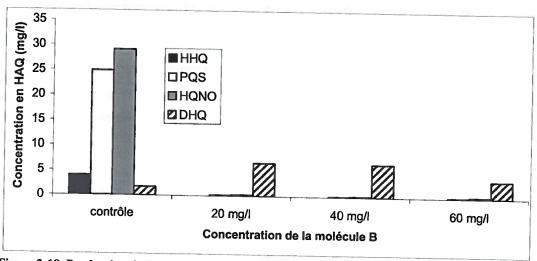


Figure 2-18. Production de HAQ et de DHQ en présence de la 2-bromo-N-(3-fluorophényl) acétamide (molécule B) dans PA14.

2.3.2.5 Conclusion préliminaire des travaux portant sur les inhibiteurs des HAQ

La recherche de nouveaux composés anti-infectieux dirigés contre des pathogènes à large spectre de résistance est une avenue prometteuse dans la lutte contre ceux-ci. Ces composés seront d'autant plus efficaces s'ils s'attaquent à l'expression de la virulence bactérienne sans compromettre la viabilité cellulaire, ce qui permet de limiter l'apparition de mécanismes de résistance contre ces composés (Clatworthy et al., 2007; Lynch & Wiener-Kronish, 2008). Les inhibiteurs découverts dans cette étude sont les premiers composés ciblant le quorum sensing et l'expression de la virulence bactérienne chez P. aeruginosa sans affecter sa viabilité (Lesic et al., 2007). Ils témoignent également de l'intérêt du système de quorum sensing MvfR-PQS comme cible pour de nouveaux traitements anti-infectieux contre P. aeruginosa. Ces nouveaux inhibiteurs sont d'autant plus intéressants qu'ils s'attaquent à des voies enzymatiques absentes chez les humains et les animaux. Toutefois, les études ont montré qu'ils affectent également la production de métabolites non contrôlés par le système MvfR-PQS (Lesic et al., 2007). Ce manque de spécificité s'avère limitant pour la mise au point de traitements médicamenteux sécuritaires pour l'homme.

2.3.3 Étude des intermédiaires de la voie de biosynthèse des HAQ

La biosynthèse du DHQ et la recherche d'inhibiteurs de la voie métabolique des HAQ étaient des projets réalisés en collaboration avec d'autres chercheurs, en parallèle à mes propres recherches dans le cadre de ma thèse. Je présente maintenant les résultats correspondant directement aux objectifs spécifiques établis pour mon projet de thèse et présentés au point 2.1.7.1.

2.3.3.1 Biosynthèse du HHQ

2.3.3.1.1 Recherche des enzymes impliquées dans la biosynthèse du HHQ

A ce jour, l'implication des enzymes PqsABCD dans la biosynthèse du HHQ a été clairement démontrée (Déziel *et al.*, 2004). Néanmoins, aucune étude ne s'est penchée sur l'implication éventuelle d'autres protéines dans cette biosynthèse.

2.3.3.1.1.1 Mutagenèse aléatoire dans un mutant pqsL

Afin de mener une étude exhaustive sur la question, j'ai réalisé une mutagenèse aléatoire sur le génome de *P. aeruginosa* PA14 pour isoler des mutants déficients dans la production de HAQ. La perte de production du HHQ peut être facilement détectée dans certaines conditions. Par exemple, un mutant *lasR* présente un phénotype de colonies au reflet métallique ou iridescent, causé par une suraccumulation de HHQ (D'Argenio *et al.*, 2007). Il est donc aisé de cribler les colonies d'un mutant *lasR* dont le phénotype d'iridescence a disparu après la mutagenèse aléatoire. Malheureusement, une mutation dans un régulateur du *quorum sensing* tel que *lasR* risque d'interférer dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du HHQ, ce qui risque de biaiser mes résultats. Par contre, un mutant *pqsL*, qui accumule aussi le HHQ, présente également de l'iridescence (D'Argenio *et al.*, 2002). Le criblage fut donc réalisé dans ce mutant.

Près de 38 000 colonies du mutant pqsL ont subi une mutagenèse aléatoire et ont été criblées. Parmi celles-ci, 29 colonies ne présentaient aucune iridescence, ce qui suggérait une déficience dans la production de HHQ. Ces 29 mutants ont été mis en culture, afin d'analyser leur croissance. Comme présenté dans le Tableau 2-1 p. 87, deux mutants (VD3.34 et VD5.17) ont une croissance fortement affectée, et n'ont pas été retenus pour la suite du projet.

Durant le test de croissance, j'ai observé que 14 des 27 mutants analysés présentaient une absence de production de pyocyanine (Tableau 2-1). Cette observation concorde avec une possible déficience dans la production des HAQ, nécessaire à l'expression de ce pigment bleu. J'ai donc quantifié les HAQ dans les 14 mutants sans pyocyanine dont la croissance n'est pas affectée, ainsi que dans 7 mutants avec pyocyanine, afin de vérifier la corrélation entre l'absence de pyocyanine et l'absence de HAQ. Ainsi 21 mutants ont été analysés par LC-MS.

Les 14 mutants affectés dans leur production de pyocyanine ont tous une concentration de HHQ inférieure à celle de la souche sauvage (Tableau 2-1). Parmi ceux-ci, 10 mutants ne produisent plus aucune trace de HHQ. Il y a donc une excellente corrélation entre l'absence de pyocyanine observée et la forte diminution de production de HHQ, exception faite du mutant 5.79, discuté plus loin (section 2.3.3.1.1.2). Ceci démontre une fois de plus que le HHQ est un inducteur du système MvfR-PQS contrôlant la production de pyocyanine et que cette dernière est un bon indicateur de la production des HAQ.

Le site d'insertion du transposon dans ces 21 mutants a ensuite été déterminé. Comme présenté dans le Tableau 2-1 et dans la Figure 2-19, les 9 mutants séquencés dont la production de HAQ a été complètement éliminée ont tous une mutation dans l'opéron pqsABCDE, ou dans son régulateur mvfR. L'absence de transposants dans le gène pqsD est probablement due au trop faible nombre de souches séquencées. La présence de plusieurs mutants affectés dans un même gène montre que le criblage recouvre plusieurs fois le génome bactérien. Le mutant pqsLVD4.7, ayant une mutation dans le gène mvfR, produit encore des HAQ. Ce résultat s'explique par la présence du transposon non pas dans le gène mvfR mais dans sa région promotrice (Tableau 2-1 et Figure 2-19). Le mutant pqsLVD1.3 n'a pas été séquencé parce qu'un test préliminaire a montré que sa production de HHQ peut être restaurée lorsqu'on exprime les gènes pqsABCD en trans, ce qui confirme que la mutation affectait l'un de ces gènes. L'analyse des mutants non-iridescents produisant toujours du HHQ sera discutée au point 2.3.3.1.1.5.

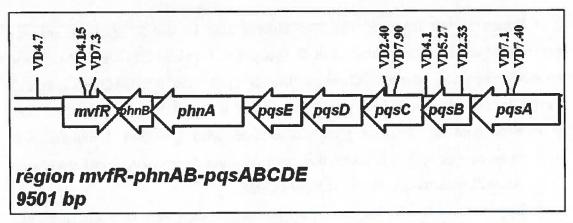


Figure 2-19. Illustration des sites d'insertion transpositionnelle dans la région mvfR-phnAB-pqsABCDE.

Tableau 2-1. Liste et caractéristiques des mutants présentant un phénotype non-iridescent.											
							Distance				

		Tacter istique	s des mutai	uts presentant	un phenot	ype non-ii	ridesc	ent.
1	ļ	ł	1		1			Distance du
1	Production		Production	1	1	l	1	site d'initiation
Nom du	de	Ì	de HHQ ⁽¹⁾	J	Name of the	Insertion		de la
mutant	pyocyanine	Croissance	(mg/l)	Gène affecté	Nom du gène	sur le	D.,	traduction
PA14	+	++	3,22	Coric affecte	gene	génome	Brin	prédit
pqsL-	+	++	10,76	 	 			
pqsL VD1.3	-	++	0		NC	L		
pqsL VD2.33	-	++	0	PA14_51420	NS pqsB	450700		
pqsL VD2.40	-	++	0	PA14_51410		4569782	+	140
pqsL VD3.2	+	++	10,39	PA14_35810		4568462		616
pqsL VD3.30	+	++	1,92	PA14 29990	gp37	3186562	<u> </u>	485
pqsL VD3.34	-	+	1,52	FA14_29990	nuoD NS	2597396	Ŀ	549
pqsL VD4.1	-	++	0	PA14_51420		4500444		
				1714_31420	pqsB	4569141	-	781
					promoteur			
pqsL VD4.7		++	0,67	PA14_51340	mvfR	4562400	+	-437
pqsL VD4.9	+	++			NS		<u> </u>	-437
pqsL VD4.12	+	++			NS			
pqsL VD4.15	-	++	0,54	PA14_51340	mvfR	4563224	+	387
pqsL VD5.8	-	++	1,22	PA14 29970	nuoF	2595156	+	509
pqsL VD5.10	-	++	1,04	PA14 43940	sucD	3912021	+	141
pqsL VD5.12	+	++		NS		00.1202.	<u> </u>	141
pqsL VD5.17		+		NS				
pqsL VD5.20	+	++		NS				
pqsL VD5.27		++	0	PA14_51420 pgsB 4569425 +		497		
pqsL VD5.31	+	++		NS			401	
	i			PA4430				
pgsL VD5.57	!				cytochrome	-		
past VD5.62		++	1,82	PA14_57560	b putatif	5127122	-	702
pqsL VD5.62	++	++			NS			
pgsL VD6.18	++	++	0	NS				
pqsL VD6.18	+	++	3,21	PA14_11860	PA4019	1028346	+	576
pgsL VD6.48	- +	++	9,55		NS			
pdsr vD0.01	 	++	13,27	PA14_62530	cbrA	5578294	-	2352
pqsL VD6.90	+	++	7.00		héparinase			
pqsL VD7.1		++	7,02	PA14_23430	putative	2037720	+	1354
pqsL VD7.3		++	0	PA14_51430	pqsA	4570577	+	892
pqsL VD7.40		++		PA14_51340	mvfR	4563314	-	477
pqsL VD7.90		++	0	PA14_51430	pqsA	4570678	-	791
JS Non Séque	E		0	PA14_51410	pqsC	4568610	-	468

NS Non Séquencé. En gras : mutants ne produisant aucun HHQ. (1) Quantification effectuée en fin de phase stationnaire dans une préculture de 15 h.

Tous ces résultats indiquent que : (i) le suivi de l'autolyse et de l'iridescence est un moyen efficace pour sélectionner des mutants affectés dans la production des HAQ, bien que d'autres mutants non-iridescents mais produisant toujours du HHQ ont également été trouvés; (ii) le suivi de la pyocyanine est également un bon indicateur de la production des HAQ, et (iii) aucun gène strictement nécessaire pour la biosynthèse des HAQ autre que ceux de l'opéron pqsABCDE et de son régulateur mvfR n'a pu être mis à jour. Ceci est également supporté par le fait qu'un criblage similaire avait été réalisé sur 25 000

colonies (D'Argenio et al., 2002), et avait fourni des résultats identiques : seules les mutations au sein des gènes pqsA, pqsB, pqsC ou pqsD induisent la perte du phénotype d'autolyse et d'iridescence dans un mutant pqsL.

L'absence de mutations au sein de la voie de biosynthèse du groupement alkyle des HAQ suggère qu'il existe plusieurs voies pour sa synthèse, ou qu'une mutation dans celle-ci est létale pour *P.aeruginosa*. La voie de synthèse du noyau quinoline, par contre, semble être unique, non létale, et requiert obligatoirement les gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC* et *pqsD*. Il est donc important de préciser que les gènes que l'on peut identifier dans ces travaux sont seulement les gènes de biosynthèse du noyau quinoline des HAQ, et que ceux impliqués dans la biosynthèse de la chaîne alkyle resteront encore à déterminer dans des études futures.

J'en conclus que les seuls gènes nécessaires pour la biosynthèse du noyau quinoline du HHQ sont les gènes de l'opéron *pqsABCDE* et leur régulateur MvfR. Toutefois, la faiblesse de ce criblage réside dans le fait que j'utilise un mutant *pqsL*, ce qui signifie que la bactérie est déjà mutée au préalable avant la mutagenèse aléatoire, ce qui peut altérer l'analyse des résultats.

2.3.3.1.1.2 Identification du transposant 5.79

Le transposant pqsLVD5.79 est particulièrement intéressant. Ce dernier produit d'importantes concentrations de pyocyanine, supérieures à celles de la souche sauvage PA14, alors qu'il ne produit aucun HAQ. Malgré cinq tentatives de séquençage, rien n'a permis d'identifier le gène affecté dans ce transposant. Transformer pqsLVD5.79 avec le plasmide pLG10 exprimant constitutivement les gènes pqsABCDE lui permet de produire à nouveau des HAQ, ce qui permet de conclure que la mutation affecte soit un gène soit un régulateur de l'opéron. Le mutant 5.79 reste le premier mutant de P. aeruginosa présentant simultanément une forte production de pyocyanine et une absence de HAQ. Ceci est difficile à interpréter puisque le système MvfR-PQS a toujours été absolument requis pour l'expression de ce pigment. Ce point est discuté à la section 3.4.3.6.7, p. 329.

2.3.3.1.1.3 Mutagenèse aléatoire et criblage en milieu acide

Lors du premier criblage, j'avais utilisé le mutant pqsL comme souche à muter, car il présente un phénotype d'iridescence et d'autolyse sur gélose, et que cette iridescence est causée par une suraccumulation de HHQ. Ce phénotype me permettait donc de cribler les bactéries affectées dans leur production de HHQ, mais avec le désavantage de travailler avec une souche déjà mutée au préalable. Pour pallier à cette faiblesse, j'ai décidé de trouver des conditions qui me permettraient d'utiliser la souche sauvage comme souche receveuse. Après quelques recherches, ce même phénotype d'iridescence peut être observé chez la souche sauvage PA14 sur un milieu solide acidifié à pH 6,5 (Luke Hoffman, information non publiée).

L'iridescence visible en milieu acide est-elle également due à une surproduction de HHQ, comme dans le cas des mutants $pqsL^-$ et $lasR^-$? Pour le vérifier, j'ai comparé la production des HAQ en milieu acide (pH 6,5) et en milieu neutre (pH 7,0) chez PA14. Comme présenté à la Figure 2-20, malgré une diminution de croissance, la production des HAQ n'est pas affectée par cette variation de pH. Sur gélose à pH 6,5, les mutants déficients dans la production de HAQ tels que les mutants $pqsA^-$, $pqsB^-$, $pqsC^-$, $pqsD^-$ et $mvfR^-$ ne présentent aucune iridescence. Je suppose donc que l'iridescence visible sur un milieu acide est due à la présence de HHQ, et ce même si celui-ci n'est pas synthétisé en excès par rapport à sa production naturelle par P. aeruginosa.

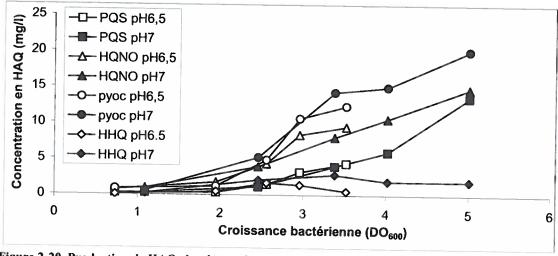


Figure 2-20. Production de HAQ chez la souche sauvage en milieu neutre et acide.

J'ai donc utilisé cette condition pour réaliser un nouveau criblage. La mutagenèse aléatoire fut réalisée avec la souche sauvage PA14 en condition acide. Les colonies ne présentant aucune iridescence ont ensuite été analysées par fluorescence afin de confirmer l'absence de HAQ. En effet, une excitation par UV est un autre moyen rapide et efficace d'identifier les souches produisant des HAQ puisque ceux-ci émettent de la fluorescence dans ces conditions (Pesci et al., 1999). Près de 33 000 colonies ont été criblées et 120 mutants ont présenté un phénotype non-iridescent. Parmi ceux-ci, 73 sont non fluorescents. Ils présentent également une absence de production de pyocyanine, à l'exception du mutant 10.41. Les mutants faiblement iridescents n'ont pas été retenus.

Afin de confirmer les résultats et de localiser l'insertion du transposon, 29 mutants choisis aléatoirement parmi les 73 identifiés ont été séquencés, et tous ont présenté une insertion transpositionnelle dans les gènes pqsA [9], pqsB [8], pqsC [7] ou pqsD [5] (Tableau 2-2 et Figure 2-21). Étant donné la redondance évidente, les 44 autres mutants n'ont pas été séquencés.

Tableau 2-2. Liste des mutants non-iridescents identifiés lors du criblage en milieu acide.

Nom du	Gène affecté		Insertion dans le		Distance pa
mutant			génome	Brin	rapport au codon start
VD10.23	VD10.23 PA14_51420		4569529		393
VD10.24	PA14_51410	pqsC	4568243	+	835
VD10.25	PA14_51420	pqsB	4569409	+	513
VD10.26_	PA14_51410	pqsC	4568243	+	835
VD10.29	PA14_51390	pqsD	4567601	+	388
VD10.40	PA14_51430	pqsA	4571352	+	117
VD10.41	PA14_51430	pqsA	4571352	+	117
VD8.76	PA14_51430	pqsA	4570572	-	897
VD9.14	PA14_51390	pqsD	4567748		241
VD9.15	PA14_51420	pqsB	4569507	1-1	415
VD9.17	PA14_51430	pqsA	4570572	-	897
VD9.18	PA14_51420	pqsB	4569350	+	572
VD9.19	PA14_51430	pqsA	4570572	_	897
VD9.20	PA14_51410	pqsC	4568381		697
VD9.21	PA14_51410	pqsC	4569056		22
VD9.22	PA14_51410	pqsC	4568243	+	835
VD9.25	PA14_51430	pqsA	4570572	_	897
VD9.26	PA14_51410	pqsC	4568243	+	835
VD9.27	PA14_51430	pqsA	4570572	-	897
VD9.31	PA14_51420	pqsB	4569447	+	475
VD9.33	PA14_51410	pqsC	4568606	-	472
VD9.35	PA14_51420	pqsB	4569350	+	572
VD9.36	PA14_51390	pqsD	4567671	+	318
VD9.37	PA14_51430	pqsA	4570525		944
VD9.39	PA14_51420	pqsB	4569508	+	414
VD9.43	PA14_51390	pqsD	4567523	+	466
VD9.44	PA14_51420	pqsB	4569507	-	415
VD9.48	PA14_51390	pqsD	4567598	-	391
VD9.49	PA14_51430	pqsA	4570572	-	897

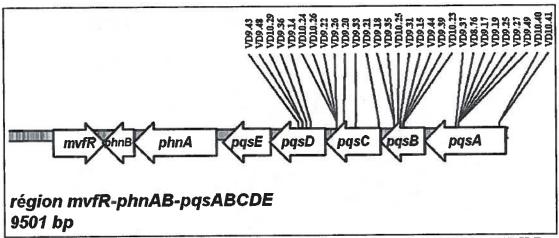


Figure 2-21. Localisation des insertions transpositionnelles dans la région mvfR-phnAB-pqsABCDE lors du criblage en milieu acide.

Il est surprenant qu'il n'y ait pas eu d'insertion dans mvfR, mais ceci s'explique par le fait que la majorité des mutants $mvfR^-$ déjà obtenus lors du criblage précédent présentaient une faible production de HAQ (Tableau 2-1). Or lors de ce criblage-ci, seuls les mutants n'émettant aucune fluorescence et donc ne produisant aucune trace de HHQ ont été sélectionnés. Les mutants faiblement fluorescents n'ont pas été pris en compte pour le séquençage. Il se peut donc que les mutants $mvfR^-$ aient été éliminés lors de cette sélection.

Enfin, aucun mutant impliqué dans la biosynthèse de la chaîne alkyle des HAQ n'a été identifié par ce criblage, ce qui confirme l'hypothèse de plusieurs voies de synthèse ou de l'effet létal d'une telle mutation chez *P. aeruginosa*. Cette dernière possibilité pourrait suggérer que la production de la chaîne alkyle des HAQ passe par la voie générale de synthèse des acides gras, essentielle à la viabilité de la cellule.

Les résultats obtenus lors du second criblage confirment que pqsA, pqsB, pqsC et pqsD sont les seuls gènes de biosynthèse du noyau quinoline du HHQ.

2.3.3.1.1.4 Identification du transposant 10.41

Parmi les transposants non-iridescents déficients dans la production de HAQ, un de ceux-ci, VD10.41, produit encore de la pyocyanine. Ce énotype n'a encore jamais été rencontré, hormis dans le transposant *pqsL*VD5.79 (voir la section 2.3.3.1.1.2, p. 88). Afin de connaître le lieu d'insertion du transposon dans VD10.41, celui-ci a été déterminé

par séquençage. Le transposon ISlacZ s'est intégré dans le gène pqsA, à 117 paires de bases en aval du codon d'initiation de la traduction. Tout comme le transposant pqsLVD5.79, VD10.41 produit des HAQ si on lui fait exprimer en trans les gènes pqsABCD sur un plasmide (pLG12), ce qui confirme une mutation dans l'opéron pqs.

Cette insertion n'explique pas la raison pour laquelle ce mutant produit toujours de la pyocyanine. En effet, dans un tel mutant, le régulon MvfR qui contrôle la production de pyocyanine indirectement *via* l'enzyme PqsE n'est pas activé.

Afin de vérifier si la présence du transposon pouvait être responsable du phénotype du mutant 10.41, le transposon a été excisé au moyen de la recombinase CreA pour ne laisser qu'une insertion finale de 63 paires de bases (Bailey & Manoil, 2002). Malgré l'excision du transposon, le mutant VD10.41 produit toujours de la pyocyanine en absence de HAQ.

PqsE est une protéine essentielle pour obtenir une production de pyocyanine (Diggle et al., 2003; Gallagher et al., 2002). Néanmoins, puisque le mutant 10.41 ne produit aucun HAQ, MvfR ne peut être activé par ses ligands et la transcription du gène pqsE doit être inhibée dans ce mutant. Comment expliquer alors la production de pyocyanine dans ces conditions? La protéine PqsE n'est-elle plus strictement nécessaire pour obtenir de la pyocyanine dans ce mutant? Pour le vérifier, la mutation présente chez le mutant 10.41 a été transférée chez la souche sauvage PA14 et chez le mutant pqsE par une méthode de recombinaison inter-génome (Choi et al., 2006). La mutation transférée dans PA14 et dans pqsE a aboli la production de HAQ. PA14-VD10.41 produit toujours de la pyocyanine en absence de HAQ, mais le double mutant pqsE 10.41 n'en produit pas. Ce résultat démontre que PqsE semble toujours essentiel pour obtenir une production de pyocyanine dans cette souche.

2.3.3.1.1.5 Identification des mutants non-iridescents produisant des HAQ

Il est intéressant d'observer que, si tous les mutants déficients dans la production de HAQ sont non-iridescents, il existe toutefois des mutants non-iridescents ayant une production de HAQ normale. Lors du criblage chez le mutant pqsL, plusieurs de ceux-ci ont été identifiés, dont 8 ont été séquencés (Tableau 2-1). Lors du criblage en milieu acide, 47 autres mutants non-iridescents et produisant toujours des HAQ ont été

sélectionnés. Afin de vérifier si les mutants identifiés lors du deuxième criblage sont les mêmes que ceux identifiés lors du premier criblage, 8 de ceux-ci ont été séquencés (Tableau 2-3).

Tableau 2-3. Liste des mutants non-iridescents produisant encore des HAQ.

Nom du mutant	Gène affecté dans PA14	Nom du gène	Fonction du gène	Insertion dans le génome	Brin	Distance par rapport au codon start
VDNI9	PA14_29990	promoteur nuoD	NADH dehydrogenase I chain C,D	2597949		-4
VDNI10	PA14_52180		GTP pyrophosphokinase	4628535	+ '	-31
VDNI11	PA14_52210	PA0932 cysM	cysteine synthase B méthyltransférase	4630228	-	621
VDNI12	PA14_61680	PA4664	putative	5504051	+	375
VDNI13	PA14_30100	PA2630	protéine hypothétique	2607114	+	666
VDNI14	PA14_10410	,	protéine hypothétique	898528	+	34
VDNI15	PA14_61680	PA4664	méthyltransférase putative	5503801	+	625
VDNI16	PA14_69230	ppk	polyphosphate kinase	6175065	+	1744

Parmi les 16 mutants non-iridescents séquencés produisant toujours des HAQ (huit lors du premier criblage et huit lors du second, voir ci-dessus), 5 présentent des insertions dans les gènes impliqués dans la respiration cellulaire bactérienne (nuoD (pqsLVD3.30 et VDNI9), nuoF (pqsLVD5.8), sucD (pqsLVD5.10) et PA14_57560 (pqsLVD5.57)). L'étude plus approfondie du lien entre la respiration cellulaire, l'iridescence et l'autolyse sera présentée au point 2.3.4, p. 123. Quant aux 11 autres gènes dont la mutation induit la disparition du phénotype d'iridescence, ils sont pour la plupart peu caractérisés, n'ont pas de lien connu avec la respiration anaérobie et ne semblent pas se regrouper dans un domaine ou une fonction commune. Il est toutefois intéressant de remarquer que deux mutants présentent une insertion dans le gène PA14_61680, codant pour une méthyltransférase putative, et que deux autres mutations ont affecté un opéron putatif

composé des gènes relA, ygcA et cysM dont au moins relA et cysM sont impliqués dans la résistance à différents stress chez P. putida (www.pseudomonas.com, (Mao et al., 2009; Reva et al., 2006)).

Il est intéressant également de constater que le mutant pqsLVD3.2 possède une insertion transpositionnelle dans une protéine hypothétique, présente dans PA14 et absente dans PA01. Celle-ci coderait une protéine de bactériophage gp37 (Revel, 1981). Une hypothèse soulevée dans la littérature serait que l'une des raisons pour lesquelles les quinolones ont une activité antibiotique est qu'elles pourraient induire l'expression de prophages endogènes (D'Argenio et al., 2002). L'expression de ces prophages expliquerait l'apparition de l'autolyse, et l'excès de HHQ libéré provoquerait l'iridescence. Cette hypothèse a toutefois perdu de sa valeur lorsque j'ai observé qu'après plusieurs repiquages le phénotype d'iridescence et d'autolyse est réapparu chez le mutant pqsLVD3.2.

Bien que tous ces résultats nous éloignent du but premier de ce criblage, ils pourraient faire l'objet d'une étude plus poussée sur les causes de l'iridescence chez P. aeruginosa (voir points 2.3.4.1.1 et 2.3.4.2.1).

2.3.3.1.1.6 Conclusion sur les enzymes requises pour la biosynthèse du HHQ

Au terme de ces deux criblages, plusieurs conclusions peuvent être mises en évidence. Sur 72 000 colonies, 149 étaient non-iridescentes et non-autolytiques. Parmi celles-ci 83 ne produisent plus aucun HHQ, et tous les mutants séquencés de ce groupe [39] ont présenté une insertion dans l'opéron pqsABCD. Quant aux mutants non-iridescents non-autolytiques produisant toujours du HHQ, ils possèdent des insertions ailleurs sur le génome, dont plusieurs affectent la respiration anaérobie de la cellule. Ceci permet de conclure que (i) l'identification de colonies non-iridescentes et non-autolytiques sur un milieu acide (pH 6,5) est une méthode valable pour cribler des mutants déficients dans la production de HHQ; (ii) que l'analyse par fluorescence est avantageuse pour confirmer l'absence totale de HHQ, tandis que l'analyse par le suivi de la pyocyanine permet de sélectionner les mutants présentant une réduction de production de HHQ et (iii) que les seuls gènes absolument requis dans la production de HHQ sont les

gènes pqsA, pqsB, pqsC et pqsD. L'étude de la voie de biosynthèse du HHQ devra donc se concentrer sur ces quatre gènes.

2.3.3.1.2 Séquence fonctionnelle des enzymes PqsABCD.

Le HHQ est synthétisé par les enzymes PqsABCD à partir d'acide anthranilique. Le rôle exact de chacune de ces enzymes ainsi que les différents intermédiaires qu'elles sont susceptibles de produire restaient encore inconnus lors de l'initiation de ce projet. De nombreuses recherches ont été effectuées, entre autres par Marie-Hélène Castonguay lors de sa maîtrise dans le laboratoire du Dr. François Lépine, en utilisant les différents mutants de l'opéron, et en analysant les métabolites retrouvés dans le surnageant. Aucun des tests n'a permis d'identifier un intermédiaire de la biosynthèse des HAQ. Néanmoins, les connaissances sur le système MvfR-PQS à cette époque étaient plus limitées. Les tests n'ont par exemple pas été réalisés en présence de PQS pour activer la transcription de l'opéron, ce qui fut systématiquement fait dans les expériences présentées ici. De plus, ces anciennes expériences étaient basées sur l'utilisation des mutants polaires de l'opéron. Bien que les gènes en aval des mutations soient légèrement transcrits dans ces mutants, leur expression n'est pas optimale, ce qui nuit à la recherche des intermédiaires de la biosynthèse du HHQ. Depuis ces derniers travaux, nos connaissances sur l'opéron pqsABCDE, et surtout la génération de nouveaux mutants non polaires de l'opéron nous permettent de réitérer et d'approfondir les recherches.

2.3.3.1.2.1 Les enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont toutes nécessaires à la production du HHQ

Dans un premier temps, il est nécessaire d'identifier la séquence fonctionnelle des quatre enzymes impliquées dans la transformation de l'acide anthranilique en HAQ. Nos travaux (Lépine et al., 2007) ainsi que d'autres (Zhang et al., 2008) ont montré que certains produits de l'opéron, tels que le DHQ, ne requièrent que les enzymes PqsA et PqsD. Il est donc possible que d'autres produits de l'opéron ne nécessitent pas l'action des quatre enzymes PqsABCD mais de seulement une ou deux d'entre elles. Afin d'évaluer cette possibilité, j'ai analysé la production du HHQ et du DHQ dans le surnageant de plusieurs mutants polaires et non polaires de l'opéron (Figure 2-22). Ceuxci étaient complémentés ou non avec un plasmide exprimant certains gènes de l'opéron.

Ils étaient également exposés à 20 mg/l de PQS dès le début de leur croissance afin d'activer la transcription de l'opéron (tel que décrit dans la section matériel et méthodes (section 2.2.1.1, p. 66), cette condition sera appliquée par défaut pour toutes les expériences ultérieures utilisant les mutants de l'opéron, sauf si spécifié autrement). Tel qu'attendu, les résultats montrent que le HHQ est produit dans toutes les souches contenant des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD fonctionnels (souche sauvage et mutants complémentés) mais est absent dans les cultures des mutants déficients pour l'un ou l'autre de ces quatre gènes. Les mutants $pqsA^-$ et $pqsD^-$ ne produisent ni HHQ ni DHQ. Par contre, les mutants $pqsB^-$ et $pqsC^-$ non polaires produisent du DHQ. Ces résultats confirment que le DHQ ne nécessite que l'action des enzymes PqsA et PqsD, alors que le HHQ requiert les 4 enzymes. La présence de DHQ chez les mutants par transposons $pqsB^-$ et $pqsC^-$ confirme que les insertions n'ont pas d'effet polaire absolu et que les gènes en aval sont encore transcrits.

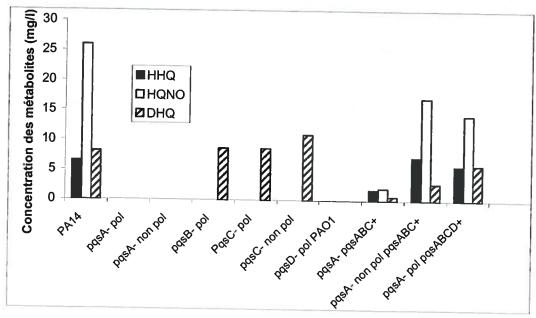


Figure 2-22. Production de HHQ, de HQNO et de DHQ dans différents mutants de l'opéron pqsABCDE.

Pol = mutants par insertion transpositionnelle. Non pol = mutants non polaires.

La fonction de PqsA est d'associer un coenzyme A à l'acide anthranilique, précurseur des HAQ (Coleman et al., 2008). Le coenzyme A, à travers le lien thioester fortement énergétique qu'il forme lorsqu'il est associé à une molécule, « active » cette dernière, et lui permet ainsi de participer à des réactions auxquelles elle ne participerait

pas si elle n'était pas activée par le coenzyme. Il est donc probable que PqsA soit la première enzyme de la séquence catalytique de la biosynthèse des HAQ, puisqu'elle est responsable de l' « activation » de l'acide anthranilique. Si l'on suppose que PqsA et PqsD fonctionnent de la même manière lors de la biosynthèse du DHQ et lors de celle des HAQ, j'ai émis l'hypothèse que PqsD soit la deuxième enzyme impliquée dans le processus, avant PqsB et PqsC.

2.3.3.1.2.2 Les enzymes PqsA et PqsD fonctionnent ensemble, les enzymes PqsB et PqsC également, dans la biosynthèse du HHQ

Dans un premier temps, il serait intéressant de savoir s'il existe un produit intermédiaire dans la biosynthèse du HHQ, synthétisé par PqsA et PqsD, à l'instar du DHQ et du 2-AA. Pour le vérifier, différents mutants de l'opéron ont été cultivés ensemble. Une première observation intéressante est que, bien que tous ces mutants pris séparément (et sans ajout de PQS) ne produisent pas de pyocyanine, plusieurs de ceux-ci cultivés ensemble en produisent. Ceci suggère que ces mutants sont capables de s'échanger des intermédiaires de biosynthèse pour parvenir à produire des HAQ et activer ainsi l'expression de pqsE, menant à la production de pyocyanine. La production de HHQ et de DHQ a été analysée dans ces différentes conditions. Tel que présenté à la Figure 2-23, les mutants seuls n'ont pas produit de HHQ. J'ai observé du HHQ dans une coculture entre pqsA et pqsB, ainsi qu'entre pqsD et pqsC. Cela signifie qu'il existe un intermédiaire extracellulaire de la biosynthèse du HHQ, que j'ai nommé pHHQ, produit par l'une des deux enzymes et utilisé comme substrat par l'autre enzyme. Par contre, une co-culture entre pqsC et pqsB ne permet pas la production de HHQ. Il n'existe donc pas d'intermédiaire extracellulaire entre l'activité de PqsC et PqsB. Puisqu'on peut déceler un intermédiaire entre PqsA et PqsB, ainsi qu'entre PqsC et PqsD, mais pas entre PqsB et PqsC, l'hypothèse selon laquelle PqsA et PqsD d'une part et PqsB et PqsC d'autre part agiraient de manière groupée semble valide.

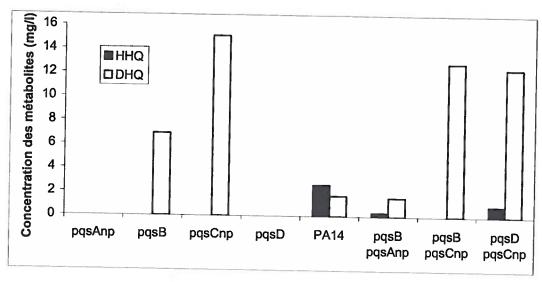


Figure 2-23. Production de HHQ et DHQ dans différents mutants de l'opéron cultivés seuls ou en co-culture, et en présence de 20 mg/l de PQS. $Np = non\ polaire$.

2.3.3.1.2.3 Le pHHQ est extracellulaire

J'ai voulu m'assurer que le pHHQ est relâché dans le milieu cellulaire et non le résultat de la lyse cellulaire naturelle lors de la croissance bactérienne. J'ai comparé la quantité de HHQ produite dans une culture du mutant $pqsA_{np}$ pqsH en présence du surnageant d'une culture lysée ou non du mutant $pqsC_{np}$ contenant le pHHQ. Le surnageant obtenu avant lyse cellulaire contient autant de pHHQ que le surnageant obtenu après la lyse. En effet, en présence du surnageant avant et après lyse cellulaire d'une culture de $pqsC_{np}$, le double mutant $pqsA_{np}$ pqsH a produit respectivement 2,94 et 2,96 mg/l de HHQ. Ce résultat montre que le pHHQ se retrouve naturellement dans le milieu extracellulaire des bactéries, du moins chez les mutants qui l'accumulent.

2.3.3.1.2.4 Le pHHQ est un produit de PqsA et PqsD et un substrat de PqsB et PqsC

D'après les résultats précédents, l'hypothèse retenue est celle où l'acide anthranilique est pris en charge par PqsA et PqsD pour fournir un intermédiaire extracellulaire appelé pHHQ, qui est ensuite transformé par PqsB et PqsC en HHQ. Dans ce cas, le surnageant de cultures des mutants pqsB et pqsC doit contenir le pHHQ, produit de PqsA et PqsD. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai cultivé tous les mutants de

l'opéron en présence de différents surnageants de ces mutants (Figure 2-24). La production de HHQ n'a eu lieu que chez les mutants $pqsA^-$ et $pqsD^-$ en présence du surnageant d'un mutant $pqsB^-$ ou pqsC. Ce résultat indique que l'action combinée de PqsA et PqsD donne du pHHQ, utilisé ensuite par PqsB et PqsC pour former du HHQ. Il démontre également qu'il n'y a pas d'intermédiaire extracellulaire entre PqsA et PqsD, ni entre PqsB et PqsC.

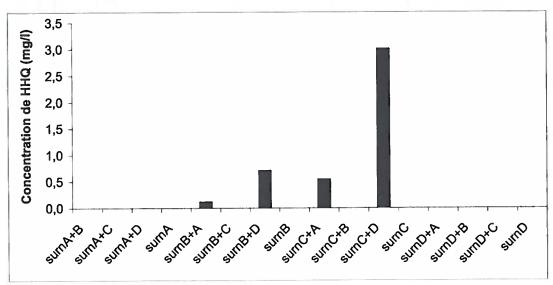


Figure 2-24. Production de HHQ chez les mutants pqs en présence de différents surnageants.

Un schéma récapitulatif des conditions de production du pHHQ est présenté dans la Figure 2-25.

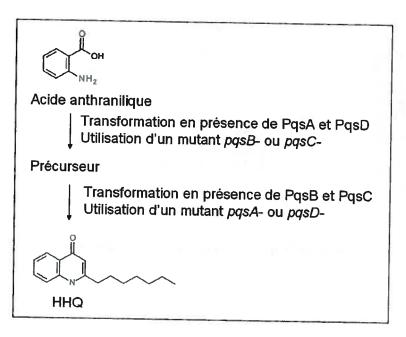


Figure 2-25. Schéma résumant les conditions utilisées pour la production et la détection du précurseur du HHQ.

Pour confirmer ces résultats, et afin de m'assurer que PqsB et PqsC sont responsables de la transformation du pHHQ en HHQ, j'ai utilisé des inhibiteurs spécifiques à PqsB et/ou PqsC, à savoir le 2-bromo-N-(3-fluorophényl) acétamide (ou molécule B) mentionné en p. 82, et l'inhibiteur M27 (voir la structure à la Figure 2-26) fourni par le laboratoire du Dre Rahme (résultats non-publiés). Ces inhibiteurs ont été incubés avec le mutant pqsA np pqsH en présence du surnageant de pqsC np contenant le pHHQ. Tel qu'attendu, en présence de ces inhibiteurs, la conversion du pHHQ en HHQ a été compromise, voire même abolie totalement en présence de la molécule B (Figure 2-26). Ce résultat confirme que PqsB et/ou PqsC sont bien essentiels pour la transformation pHHQ en HHQ.

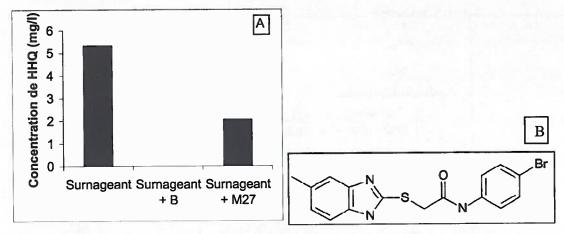


Figure 2-26. Production de HHQ en présence des inhibiteurs B ou M27, dans un mutant pqsA np pqsH.

(A) quantité de HHQ détectée par LC-MS. Le surnageant utilisé est un surnageant du mutant pqsC_{np} activé avec du PQS. (B). Structure du M27.

2.3.3.1.3 Identification du pHHQ

L'étude de la séquence fonctionnelle des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD au point précédent a permis d'affirmer que PqsA et PqsD étaient les premières à être utilisées pour la transformation de l'acide anthranilique. Le produit de ces deux enzymes, le pHHQ se retrouve dans le surnageant, puis est utilisé par les enzymes PqsB et PqsC pour être transformé en HHQ. Toujours dans le but de caractériser la voie de biosynthèse du HHQ, le point suivant vise à identifier le pHHQ.

2.3.3.1.3.1 Le pHHQ est polaire

Le surnageant du mutant $pqsC_{np}$ a été extrait à l'acétate d'éthyle, afin de déterminer si le pHHQ est polaire ou non. La fraction non polaire concentrée deux fois et la fraction aqueuse ont ensuite été ajoutées dans une culture d'un mutant $pqsA_{np}$ pqsH supplémenté de PQS. Le HHQ a été détecté chez le mutant $pqsA_{np}$ pqsH en présence de la fraction aqueuse du mutant $pqsC_{np}$ seulement (Figure 2-27). Le pHHQ est donc polaire.

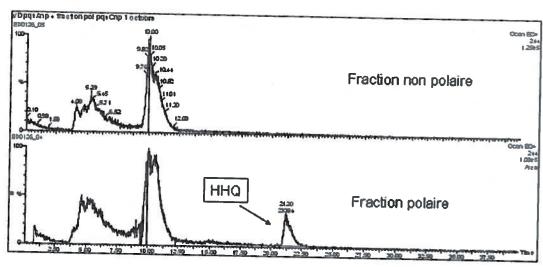


Figure 2-27. Production de HHQ dans un mutant $pqsA_{np}$ pqsH exposée à la fraction polaire ou non polaire d'un surnageant de $pqsC_{np}$.

Dans le but de trouver une méthode pour extraire le pHHQ du surnageant, l'extraction à l'acétate d'éthyle a été répétée en condition acide (ajout de HCl jusqu'à obtention d'un pH 1,3) et alcaline (ajout de NH₄OH jusqu'à obtention d'un pH 10,1). Les différentes extractions ont ensuite été ajoutées à une culture de pqsA np pqsH et la production de HHQ a été analysée. Aucune de ces conditions n'a généré la production de HHQ. Le pHHQ n'a donc pas pu être extrait du surnageant en condition acide ou basique.

2.3.3.1.3.2 Le précurseur du HHQ est dérivé de l'acide anthranilique

Afin de confirmer que le pHHQ est dérivé de l'acide anthranilique, j'ai rajouté 50 mg/l d'acide anthranilique tétradeutéré à une culture du mutant $pqsC_{np}$. Le surnageant, une fois filtré, a été inoculé avec le double mutant $pqsA_{np}$ pqsH, et du HHQ tétradeutéré a été détecté par LC-MS, ce qui a confirmé que le pHHQ est bien dérivé de l'acide anthranilique.

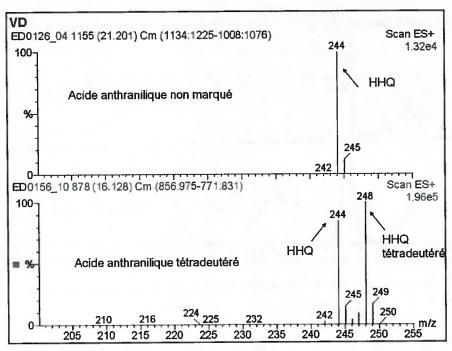


Figure 2-28. Production de HHQ deutéré dans un mutant $pqsA_{np}$ pqsH en présence du surnageant d'un mutant $pqsC_{np}$ nourri à l'acide anthranilique deutéré ou non.

2.3.3.1.3.3 Le DHQ, le HHQ avec ester méthylique et l'acide anthranilique CoA ne sont pas les substrats de PqsB et PqsC

Afin de s'assurer que le DHQ, qui est un produit de PqsA et PqsD, ne peut pas être le pHHQ, 20 mg/l de DHQ ont été donnés au mutant pqsA np pqsH. En parallèle, de l'anthranoïl CoA a également été donné à ce mutant. Après 9 heures d'incubation, le surnageant de ces cultures a été analysé par LC-MS. Comme attendu, il n'y a pas eu de production de HHQ. Le DHQ et l'anthranoïl CoA ne sont donc pas les substrats des enzymes PqsB et PqsC menant à la production de HHQ.

Une autre hypothèse soulevée est que le pHHQ soit un HHQ possédant un groupement supplémentaire (Figure 2-29), clivé par la suite par PqsC. Un modèle hypothétique contenant un ester méthylique a été synthétisé dans le laboratoire du Dr. François Lépine et a été ajoutée à une culture du mutant $pqsA_{np}$ pqsH. Cependant, aucune production de HHQ n'a été détectée dans ces conditions non plus.

Figure 2-29. Structure d'un analogue du HHQ contenant un ester méthylique.

2.3.3.1.3.4 Purification partielle du pHHQ

Le surnageant d'un mutant $pqsC_{np}$ a été extrait à l'acétate d'éthyle afin d'éliminer les molécules non polaires présentes. La phase aqueuse obtenue après cette extraction a été fractionnée au HPLC afin de purifier le pHHQ. Les différentes fractions obtenues ont ensuite été inoculées avec le double mutant $pqsA_{np}$ pqsH, toujours en présence de PQS. Une forte production de HHQ a été détectée lorsque le double mutant a été cultivé en présence de la phase polaire totale non fractionnée, ainsi que dans la fraction 5-10 min. (Figure 2-30). On peut donc séparer le pHHQ par HPLC, et ce dernier se situe essentiellement dans cette fraction.

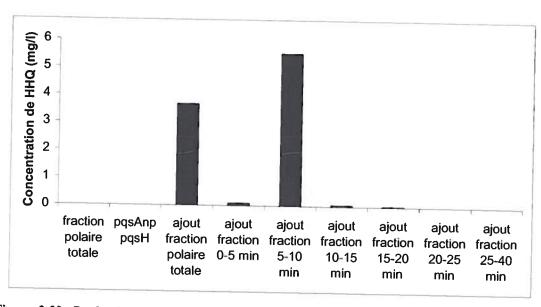


Figure 2-30. Production de HHQ par $pqsA_{np}$ pqsH en présence de différentes fractions du surnageant de pqsC non polaire.

La fraction 5-10 min. a été analysée au LC-MS, afin de trouver une molécule majoritaire correspondant au pHHQ, et absente dans les autres fractions. Cependant, aucune molécule présente spécifiquement dans cette fraction n'a pu être observée en quantité significative, tant en mode positif qu'en mode négatif par LC-MS.

Afin de purifier davantage le pHHQ présent dans la fraction 5-10 min., j'ai répété l'expérience en séparant une seconde fois la fraction 5-10 min. en deux fractions (5-7 min. et 7-10 min.). Afin de faciliter l'identification du pHHQ par LC-MS, de l'acide anthranilique tétradeutéré a été ajouté aux bactéries produisant le précurseur. En plus du mutant $pqsC_{np}$, j'ai cultivé également le mutant $pqsA^-$ dans les mêmes conditions afin d'obtenir un témoin négatif adéquat comme comparatif pour les chromatogrammes. Le surnageant polaire des deux souches a donc été fractionné et les fractions 5-7 min. et 7-10 min. inoculées avec le double mutant $pqsA^-_{np}$ pqsH. Comme attendu, les bactéries cultivées en présence des fractions du surnageant de $pqsA^-$ n'ont pas produit de HHQ, alors que celles cultivées avec les fractions du surnageant de $pqsC_{np}$ en ont produit, autant dans la fraction 5-7 min. que dans la fraction 7-10 min. (Figure 2-31). Ce sous-fractionnement n'a donc pas permis une meilleure purification du pHHQ. Par la suite j'ai travaillé directement avec la fraction 5-10 min.

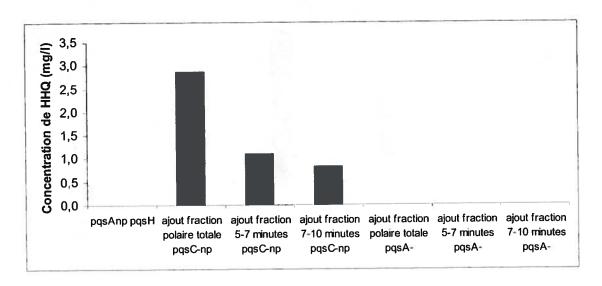


Figure 2-31. Production de HHQ par le mutant $pqsA_{np}^{-}$ pqsH en présence de différentes fractions HPLC.

Lors de l'analyse comparative entre les fractions 5-7 min. de $pqsC_{np}$ et de pqsA, aucune molécule tétradeutérée présente uniquement dans le surnagent du mutant $pqsC_{np}$ n'a pu être détectée, en dehors du DHQ. Le DHQ se trouve également dans la fraction 7-10 min. Puisque le DHQ se retrouve dans toutes les fractions où se situe le pHHQ, cela laisse penser qu'il partage avec lui plusieurs propriétés physico-chimiques.

2.3.3.1.3.5 Détection du précurseur du HHQ

Une autre approche a été explorée. De l'acide anthranilique tétradeutéré a été ajouté dans une culture du mutant $pqsC_{np}$, afin d'identifier les molécules produites à partir d'acide anthranilique, présentes dans ce surnageant et absentes dans un mutant pqsA. Malheureusement, aucune molécule détectable par LC-MS dans nos conditions autre que le DHQ n'a présenté une augmentation de masse de 4 daltons dans le surnageant de $pqsC_{np}$.

L'acide anthranilique et le HHQ étant des molécules aromatiques visibles au spectre ultraviolet (excitation à une longueur d'onde de 254 nm), j'ai émis l'hypothèse selon laquelle mon précurseur devrait également y être visible. En passant la fraction 5-10 min. du mutant $pqsC_{np}$ aux UV, aucune molécule n'a présenté de fluorescence. Le spectre UV de la fraction 5-10 min. du mutant $pqsC_{np}$ est similaire à celui du mutant $pqsA^{-}$.

La fraction 5-10 min. du surnagent de $pqsC_{np}$ a également été analysée par un spectromètre MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry), dans le laboratoire du Dr. Alain Fournier. Cette fraction a été comparée à la fraction 5-10 min. du surnageant du mutant pqsA, qui ne produit pas le pHHQ. Aucune molécule en quantité significative n'a pu être détectée dans le surnageant du mutant $pqsC_{np}$ uniquement, mis à part le DHQ.

L'une des hypothèses avancée à ce stade fut que le pHHQ soit lié à une protéine, ce qui empêche sa détection lors des analyses standard au LC-MS. Afin de vérifier si le pHHQ est lié à une protéine, j'ai passé la fraction 5-10 min. du mutant $pqsC_{np}$ sur un filtre dont les pores bloquent le passage des molécules supérieures à 3000 daltons. Le filtrat et le rétentat ont ensuite été inoculés avec le mutant $pqsA_{np}$ pqsH. En présence du filtrat, mais non du rétentat, le double mutant a produit du HHQ (Figure 2-32). Ce résultat

montre que le pHHQ n'est pas associé à une molécule d'un poids moléculaire supérieur à 3000 daltons.

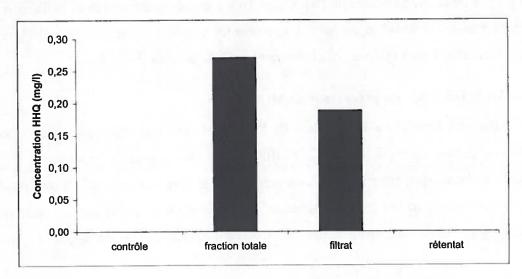


Figure 2-32. Production de HHQ par le mutant $pqsA_{np}^{-}pqsH$ en présence de la fraction 5-10 min. du surnageant de $pqsC_{np}$ contenant les molécules de masse supérieure (rétentat) ou inférieure (filtrat) à 3000 Da.

Témoin négatif : double mutant pqsA np pqsH sans ajout de molécules.

Une autre hypothèse qui expliquerait le problème de détection du pHHQ est qu'une petite protéine associée au pHHQ soit dégradée lorsque ce complexe s'accumule chez le mutant $pqsC_{np}$, en absence des enzymes capables de compléter la synthèse du HHQ. Le pHHQ serait donc lié à une protéine dont la dégradation partielle affecte la masse du complexe. De ce fait, le spectromètre de masse ne parvient pas à identifier une molécule de masse spécifique. Afin de pallier à cette difficulté, j'ai traité la fraction contenant le pHHQ avec de l'hydrazine (NH₂NH₂). L'hydrazine vient briser le lien ester ou thioester entre le pHHQ et la protéine avec laquelle il pourrait être associé et remplace le groupement protéique par un groupement hydrazide (Figure 2-33) (Fedor & Bruice, 1964).

Figure 2-33. Réaction de l'hydrazine (NH_2H_2) avec les liens ester ou thiolester. R = co-facteur ou enzyme activant le lien ester ou thiolester.

De l'hydrazine a été ajoutée au filtrat de pqsA et de pqsC, qui a été analysé ensuite au LC-MS. Cependant, aucune molécule présente dans le filtrat de pqsC et absente dans le filtrat de pqsA n'a pu être détectée. L'expérience a été répétée en présence de HCl, toujours dans le but d'hydrolyser le lien entre la protéine hypothétique et le précurseur du HHQ. De nouveau, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre le surnageant hydrolysé de pqsA et celui de pqsC. Afin de vérifier si le pHHQ est toujours convertible en HHQ, le surnageant hydrolysé de pqsC a été neutralisé et donné à un mutant pqsA np pqsH. Les bactéries en présence du surnageant hydrolysé ont eu un problème de croissance qui n'a pas permis d'analyser la production de HHQ. L'expérience a été répétée deux fois sans succès. La toxicité est très probablement due à l'excès de NaCl généré lors de la reneutralisation de la solution. Je ne peux donc pas déterminer si l'hydrolyse ou l'hydrazinolyse affectent la transformation du pHHQ en HHQ.

2.3.3.1.3.6 Le précurseur du HHQ possède-t-il une chaîne aliphatique ?

Afin d'améliorer les conditions de détection du pHHQ, il était utile d'approfondir les connaissances sur sa structure et ses propriétés. Par exemple, il était intéressant de déterminer si le pHHQ possède ou non la chaîne aliphatique du HHQ. Dans ce but, le pHHQ a été produit par un mutant $pqsC_{np}$ dans un milieu minimal dont la seule source de carbone est de l'acétate possédant deux atomes de carbone 13 (13 C). Si le pHHQ possède

une chaîne aliphatique, celle-ci sera donc marquée. Le surnageant de cette culture fut ensuite inoculé avec le double mutant pqsA np pqsH, dans le milieu minimal en présence d'acétate non marqué comme seule source de carbone, pour produire le HHQ. Le test inverse a également été réalisé, en utilisant de l'acétate non marqué lors de la production du pHHQ et de l'acétate marqué lors de la production du HHQ. Les différents surnageants ont été analysés par LC-MS afin de déterminer dans quelles conditions la chaîne acyle du HHQ produit était marquée. Dans le HHQ, neuf carbones sont originaires du précurseur de la chaîne acyle. Le HHQ marqué possède donc 9 daltons de plus que le non marqué. Toutefois, aucune des deux conditions n'a mené à la production d'une molécule de HHQ marquée par 9 daltons. Une production de HHQ non marqué (m/z + 1 = 244) et un ion pseudo-moléculaire de m/z + 1 = 252 étaient visibles dans les deux conditions. La présence de HHQ non marqué dans les deux conditions laisse suggérer un problème de contamination, probablement lors de l'analyse LC-MS, car les sources de carbone disponibles n'auraient dû permettre la production de HHQ non marqué que dans l'une ou l'autre des deux expériences. De plus, les quantités de HHQ détectées sont très faibles, ce qui suggère que les conditions expérimentales ne sont pas optimales pour sa production. Aucune conclusion ne peut donc être donnée à ce stade. L'expérience devra être recommencée et améliorée.

2.3.3.1.3.7 Production de HHQ in vitro à partir du pHHQ

Lorsque le pHHQ est donné à des bactéries vivantes contenant les enzymes PqsB et PqsC, celui-ci est transformé en HHQ. Si cette transformation se fait en peu d'étapes, celle-ci peut avoir lieu dans une solution contenant les enzymes bactériennes intracellulaires, en absence de bactéries vivantes. Afin de le vérifier, le surnageant de pqsC contenant le pHHQ a été mis en présence du contenu intracellulaire d'un mutant pqsD. Après 90 min. d'incubation, la production de HHQ a quadruplé. En absence du pHHQ ou des enzymes PqsB et PqsC, aucun HHQ n'a été produit (Figure 2-34). Ces résultats supportent la thèse d'une transformation enzymatique impliquant peu d'enzymes entre le pHHQ et le HHQ.

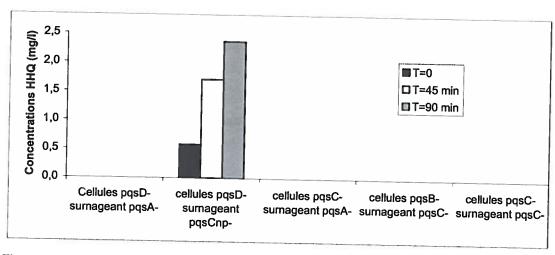


Figure 2-34. Production de HHQ in vitro.

2.3.3.1.3.8 Conclusions sur la voie de biosynthèse du HHQ

Au terme de cette étude, plusieurs nouvelles connaissances ont été apportées sur la voie de la biosynthèse du HHQ. Pour la première fois il a été démontré qu'il existe, chez le mutant $pqsC_{np}$, un précurseur intermédiaire de la voie de biosynthèse du HHQ. Celuici est polaire, extracellulaire, produit de PqsA et PqsD et substrat de PqsB et PqsC. Malheureusement, aucune condition n'a permis de détecter ce précurseur par spectrométrie de masse, bien que les évidences biologiques soient incontestables. Ceci peut être dû à l'association de ce précurseur avec une molécule qui le dissimulerait lors des analyses standard de détection par LC-MS. Le laboratoire continue à explorer cette avenue et à mettre au point de nouvelles méthodes de détection afin de mieux caractériser cette nouvelle molécule.

2.3.3.2 Biosynthèse du HQNO

En parallèle à l'étude de la voie de biosynthèse du HHQ, celle du HQNO a également été explorée.

2.3.3.2.1 Recherche des enzymes impliquées dans la biosynthèse du HQNO

Le HQNO, ou 4-hydroxy-2-alkylquinoline N-oxyde, est également une molécule appartenant à la famille des HAQ. Pour être produite, celle-ci nécessite la présence des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD (Déziel et al., 2004), ainsi qu'une autre enzyme

codée ailleurs sur le génome (Déziel et al., 2004). Cette enzyme est nommée PqsL (D'Argenio et al., 2002). Au moment où ce projet a été entrepris, la voie de biosynthèse du HQNO restait aussi peu explorée que celle du HHQ. Puisque le HHQ n'est pas un précurseur du HQNO (Déziel et al., 2004) et qu'une mutation dans le gène pqsL mène à une augmentation de la production de HHQ et de PQS (D'Argenio et al., 2002), cela suggère que leur voie de synthèse pourrait avoir des précurseurs communs. Le HQNO est également un dérivé de l'acide anthranilique (Déziel et al., 2004). Cette nouvelle section est dédiée à l'étude approfondie de sa voie de biosynthèse.

2.3.3.2.1.1 L'opéron pqsABCDE et le gène pqsL sont nécessaires à la production de HQNO

Comme dans le cas du HHQ, il était nécessaire de déterminer au préalable les enzymes impliquées dans la transformation de l'acide anthranilique en HQNO. Afin de mettre au point une approche semblable à celle utilisée pour les gènes de biosynthèse du HHQ, il fallut établir un phénotype permettant d'identifier les souches déficientes dans la production de HQNO après une mutagenèse aléatoire. Si son rôle antimicrobien ciblant principalement les bactéries à Gram positif est bien connu, aucune étude ne s'est penchée sur l'effet éventuel du HQNO sur *P. aeruginosa*. Les seules connaissances à ce jour sont qu'un mutant *pqsL* présente de l'iridescence et de l'autolyse (D'Argenio *et al.*, 2002), mais l'implication du HQNO dans ce phénotype n'a jamais été étudiée.

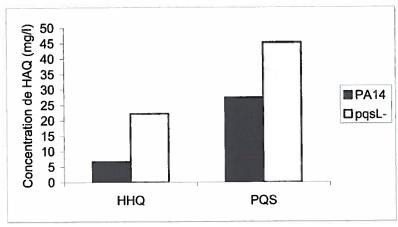


Figure 2-35. Production de HAQ dans un mutant pqsL en fin de phase stationnaire (DO₆₀₀ = 7).

Afin de déterminer si les gènes pqsABCD et pqsL sont suffisants pour générer du HQNO, ceux-ci ont été exprimés dans E. coli. Deux souches ont été mises en co-culture. La première contient deux plasmides, l'un exprimant mvfR (pDN18-mvfR) et l'autre pqsABCD (pLG12). La seconde souche contient un plasmide exprimant pqsL (pVD08). Le surnageant de cette co-culture a été analysé par LC-MS afin de quantifier la production de HQNO. Les résultats montrent que le HQNO n'a pas été produit. Ceci peut être expliqué par plusieurs raisons: (i) le HQNO nécessite la présence de gènes supplémentaires; (ii) les deux souches n'ont pas pu échanger le(s) produit(s) intermédiaire(s) car ceux-ci ne sont pas extracellulaires; (iii) le gène pqsL n'est pas exprimé correctement par E. coli (les vecteurs pDN18mvfR et pLG12 fonctionnent chez E. coli, comme cela a déjà été démontré (Xiao et al., 2006a)).

Afin de vérifier si les produits intermédiaires peuvent être échangés entre des bactéries exprimant soit l'opéron pqsABCD soit le gène pqsL, une co-culture entre un mutant pqsA et un mutant pqsA a été réalisée. Cette co-culture a produit du HQNO, ce qui prouve que ces mutants ont échangé un intermédiaire métabolique via leur environnement extracellulaire.

Afin de vérifier la fonctionnalité des différents gènes exprimés chez *E. coli*, plusieurs tests ont été réalisés. Un surnageant du mutant pqsL nourri à l'acide anthranilique tétradeutéré a été inoculé avec la souche *E. coli* exprimant pqsL (pVD08), mais aucune production de HQNO n'a pu être détectée de manière reproductible. Néanmoins, de gros problèmes de croissance ont été observés (après 24 heures, la DO₆₀₀ a atteint un sommet de 2, alors qu'en absence du surnageant de pqsL les souches ont atteint cette densité après environ 6 heures). L'expérience a été répétée, mais il semble que *E. coli* soit affecté par certains facteurs extracellulaires sécrétés par *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2010) et les problèmes de croissance n'ont pas pu être résolus. Ceci ne me permet donc pas de confirmer la bonne expression de pqsL dans *E. coli*.

Du HHQ (0,44 mg/l) a été détecté chez la souche d'*E. coli* exprimant *mvfR* et *pqsABCD*, ce qui montre que ces gènes génèrent des protéines fonctionnelles dans cette bactérie. Toutefois, aucune production de HHQ n'a été détectée dans la co-culture avec *E. coli* exprimant *pqsL* (pVD08). Ceci suggère que l'absence de production de HQNO dans la co-culture est au moins en partie due à un problème d'expression des gènes

pqsABCD ou mvfR puisque le HHQ n'est pas présent non plus. L'expérience a été répétée trois fois et le même problème est survenu.

Ces expériences ne permettent donc pas de confirmer que les gènes *pqsABCD* et *pqsL* sont suffisants pour produire du HQNO. De nouveaux tests devront être élaborés pour approfondir la question.

2.3.3.2.1.2 PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont tous nécessaires pour produire du HQNO.

En parallèle avec la recherche de tous les gènes impliqués dans la biosynthèse du HQNO, j'ai étudié le rôle des protéines déjà identifiées qui participent à cette biosynthèse.

Pour vérifier que les quatre protéines PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont toutes requises pour produire du HQNO, j'ai quantifié cette molécule en absence de chacune de ces enzymes. Le HQNO n'a été détecté dans le surnageant d'aucun mutant de l'opéron, sauf si le gène défectueux est exprimé en *trans* sur un plasmide (Figure 2-22, p. 97). Donc, tout comme pour le HHQ, la production de HQNO nécessite la présence de ces quatre enzymes.

2.3.3.2.2 Séquence fonctionnelle des enzymes impliquées dans la biosynthèse du HQNO

Dans le but de mieux comprendre le processus de biosynthèse du HQNO, il est nécessaire de connaître la séquence fonctionnelle des enzymes impliquées.

2.3.3.2.2.1 La biosynthèse du HQNO passe par un précurseur intermédiaire extracellulaire produit de PqsA et PqsD et substrat de PqsB et PqsC

Puisque les enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont autant impliquées dans la production du HHQ que du HQNO, il est intéressant de voir si leur voie de biosynthèse est semblable. La production du HQNO a été analysée dans les cultures des mutants de l'opéron pqs, en présence de différents surnageants, tout comme cela avait été fait pour le HHQ. La Figure 2-36 montre que, comme le HHQ (Figure 2-23, p. 99), le HQNO est produit par les bactéries qui possèdent les enzymes PqsB et PqsC fonctionnelles et qui sont exposées au surnageant d'un mutant possédant les enzymes PqsA et PqsD

fonctionnelles. Le HQNO possède donc également un précurseur produit de PqsA et PqsD et substrat de PqsB et PqsC.

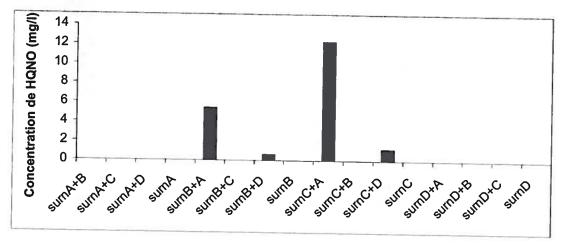


Figure 2-36. Production de HQNO dans différents mutants de l'opéron pqs en présence de différents surnageants.

2.3.3.2.2.2 La protéine PqsL agit en aval de la protéine PqsA.

La différence majeure entre la voie de biosynthèse du HHQ et celle du HQNO est l'implication de la protéine PqsL pour produire ce dernier. Par contre, sa place dans la voie de biosynthèse n'a jamais été étudiée. PqsL agit-elle en amont ou en aval des gènes de l'opéron pqs? Aucune molécule marquée n'a été observée dans le surnageant du mutant pqsA exprimant en trans pqsL (pVD08) et nourri à l'acide anthranilique tétradeutéré, ce qui suggère que l'acide anthranilique n'est pas le substrat de PqsL.

Le surnageant d'un mutant pqsL a été inoculé avec le mutant $pqsA_{np}$. Inversement, le surnageant de pqsA a été inoculé avec le mutant pqsL. L'analyse de la production de HQNO par LC-MS démontre que le HQNO n'est présent que dans la première condition, ce qui signifie que la protéine PqsL agit après PqsA (Figure 2-37). La production de HQNO dans un mutant pqsA en présence du surnageant de pqsL indique également que le substrat de PqsL, nommé pHQNO, est extracellulaire.

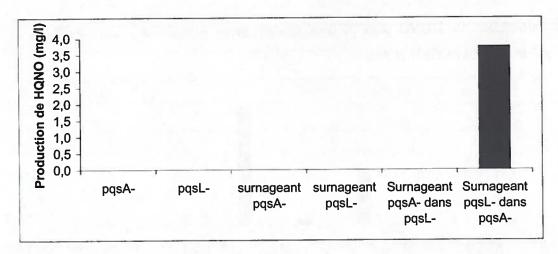


Figure 2-37. Production de HQNO dans différents mutants exposés ou non au surnageant des mutants $pqsA^-$ et $pqsL^-$.

2.3.3.2.2.3 La protéine PqsL agit probablement en amont de PqsB et PqsC

Selon les résultats obtenus dans l'étude du pHHQ, je sais qu'il existe plusieurs étapes dans la voie de biosynthèse des HAQ qui libèrent des composés dans le milieu extracellulaire. Le DHQ et le pHHQ sont des produits extracellulaires de PqsA et PqsD, et les autres HAQ sont des produits extracellulaires de PqsABCD. Puisque le substrat de PqsL est également extracellulaire, il peut donc être le produit de PqsA et PqsD seulement, ou celui de PqsABCD.

La présence d'une enzyme de biosynthèse supplémentaire, PqsL, ajoute des étapes supplémentaires à la voie de biosynthèse, ce qui peut possiblement générer plus d'un intermédiaire (Figure 2-38). Bien que la voie de biosynthèse du HQNO passe incontestablement par un précurseur extracellulaire produit de PqsA et PqsD, le pHQNO1 (voir 2.3.3.2.2.1, p. 114), la suite reste encore imprécise. En effet, le pHQNO1 peut être directement utilisé par PqsBC pour produire un second précurseur, nommé pHQNO2a, qui sera ensuite converti en HQNO par PqsL, mais il peut également être transformé directement par PqsL pour générer un autre précurseur, nommé pHQNO2b. Les données présentées à ce stade ne permettent pas de déterminer laquelle de ces deux voies de biosynthèse emprunte le HQNO.

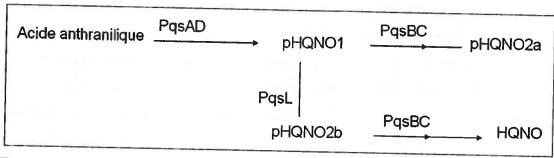


Figure 2-38. Schéma hypothétique de la biosynthèse du HQNO. Les flèches en gras indiquent la voie la plus plausible selon les résultats préliminaires.

Afin de répondre à cette question, l'expérience précédente (section 2.3.3.2.2.2 p. 115) a été répétée en remplaçant le mutant pqsA par un mutant pqsC. Aucune production de HQNO n'a été détectée chez le mutant $pqsC_{np}$ en présence du surnageant de pqsL. Il s'avère donc que la transformation du substrat de PqsL (pHQNO1 ou pHQNO2a, voir Figure 2-38) en HQNO nécessite la présence de PqsC (Figure 2-39). Ce résultat appuie donc l'hypothèse selon laquelle PqsL agirait en amont de PqsC (et possiblement de PqsB également), et donc l'existence du pHQNO2b.

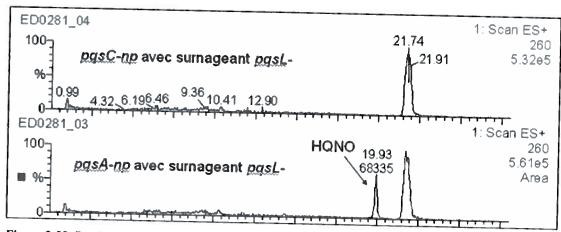


Figure 2-39. Production de HQNO chez les mutants $pqsA_{np}$ et $pqsC_{np}$ en présence de surnageant du mutant pqsL.

Afin de confirmer l'hypothèse de l'existence du pHQNO2b, le schéma inverse a été réalisé. Le surnageant du mutant pqsC (qui produit le pHQNO1 et hypothétiquement le pHQNO2b) a été donné à un mutant pqsL. Grâce à PqsB et PqsC, exprimés chez le mutant pqsL, il devrait y avoir une synthèse de HQNO. Aucune production de HQNO

n'a pourtant été détectée dans ces conditions. Il est possible que ceci soit dû à l'instabilité du produit du HQNO2b. Afin de pallier à cette difficulté, j'ai tenté de minimiser le temps entre la production du pHQNO2b et sa transformation par les enzymes PqsB et PqsC. J'ai utilisé des surnageants du mutant pqsC obtenus à différentes densités cellulaires et les ai directement donnés au mutant pqsL lorsque celui-ci commence à produire ses HAQ, c'est-à-dire vers une DO600 de 2. Malgré ces tentatives d'optimisation, le HQNO n'a pas été détecté. Ces résultats ne permettent donc pas de confirmer l'hypothèse que PqsL agit en amont de PqsC.

2.3.3.2.3 Identification du substrat de PqsL

A ce stade de l'étude, les résultats indiquent qu'il existe un précurseur extracellulaire du HQNO produit de PqsA et PqsD (pHQNO1) et que celui-ci est transformé par les enzymes PqsB et PqsC, ainsi que par PqsL, dans une séquence encore non définie. Étant donné la possible instabilité du pHQNO2b, les expériences suivantes se sont focalisées sur la caractérisation du pHQNO1. Celui-ci pourrait nous apporter de précieuses indications quant à la séquence fonctionnelle des enzymes de biosynthèse du HQNO.

2.3.3.2.3.1 Le DHQ et l'acide anthranilique coenzyme A ne sont pas le pHQNO1

Un ajout de DHQ ou d'acide anthranilique activé en CoA a été effectué dans une culture d'un mutant pqsA np pqsH. Aucun HQNO n'a pu être détecté dans le surnageant de cette culture analysé par LC-MS, ce qui suggère que ces composés ne sont pas le précurseur pHQNO1. L'acide anthranilique CoA fait vraisemblablement partie des intermédiaires intracellulaires de la voie de biosynthèse du HQNO, comme dans le cas de la biosynthèse du HHQ.

2.3.3.2.3.2 Le pHQNO1 s'accumule dans le temps

Afin de faciliter l'identification du pHQNO1, il est important de déterminer à quel moment lors de la croissance cellulaire sa concentration est la plus élevée. Différents surnageants du mutant pqsL, pris tout au long de la croissance cellulaire, ont été inoculés avec le mutant pqsL. Tel que montré à la Figure 2-40, le pHQNO1 s'accumule dans le

surnageant du mutant $pqsL^-$. Le surnageant du mutant $pqsL^-$ sera donc toujours récolté en phase stationnaire de croissance bactérienne pour les expériences ultérieures.

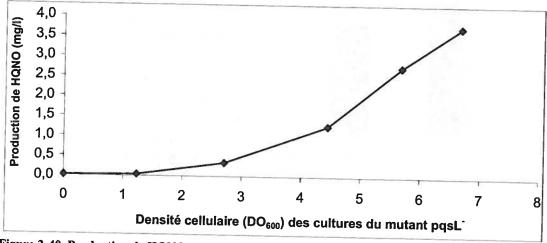


Figure 2-40. Production de HQNO par le mutant $pqsA^-$ exposé au surnageant d'un mutant $pqsL^-$ pris à différents temps de croissance.

2.3.3.2.3.3 Le précurseur du HQNO produit de PqsA et PqsD possède les même propriétés que le précurseur du HHQ

Étant donné la ressemblance entre le processus de biosynthèse du HHQ et du HQNO par les enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD, les expériences liées à l'identification du pHHQ ont été répétées pour le pHQNO1. Un résumé des résultats obtenus est présenté ici. Il s'avère ainsi que le pHQNO1 a de nombreuses caractéristiques communes avec le pHHQ: (i) il est le produit de PqsA et PqsD, et le substrat de PqsB et PqsC (Figure 2-36, p. 115), (ii) il est extracellulaire (Figure 2-41A), (iii) il est polaire (Figure 2-41B), (iii) il est dérivé de l'acide anthranilique (Figure 2-41C), (iv) il possède une masse inférieure à 3000 daltons (Figure 2-41D) et (v) il se retrouve dans la même fraction HPLC du surnageant polaire de $pqsC_{np}$ (Figure 2-41E).

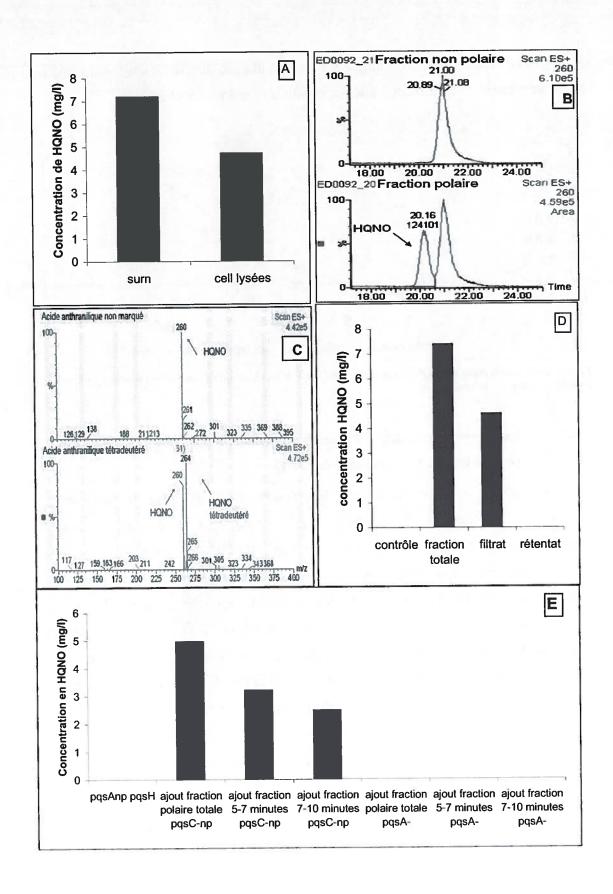


Figure 2-41. Caractérisation pHQNO1.

Production de HQNO dans un mutant $pqsA_{np}$ pqsH: (A) en présence du surnageant de $pqsC_{np}$ avant et après lyse cellulaire; (B) en présence de la fraction polaire ou non polaire du surnageant de $pqsC_{np}$; (C) en présence d'un surnageant de $pqsC_{np}$ nourri avec de l'acide anthranilique tétradeutéré ou non marqué; (D) en présence du filtrat et du rétentat d'un surnageant de $pqsC_{np}$ passé sur un filtre de 3000 daltons. Témoin = mutant $pqsA_{np}$ pqsH sans ajout; (E) en présence des différentes fractions polaires du surnageant de $pqsC_{np}$ passées au HPLC.

La fraction polaire du surnageant du mutant pqsL supplémenté d'acide anthranilique tétradeutéré a été analysée par LC-MS afin d'identifier des dérivés de l'acide anthranilique marqués. Cependant, hormis le DHQ, aucune molécule n'a pu être identifiée.

2.3.3.2.3.4 Purification partielle du substrat de PqsL

La méthode la plus simple de purification et de concentration d'une molécule est son extraction au moyen d'un solvant. Malheureusement, les propriétés très polaires du pHQNO1 lui font préférer la phase aqueuse et non la phase organique. Toutefois, l'acétone est un solvant beaucoup plus polaire que l'acétate d'éthyle, généralement utilisé. Ce solvant est tellement polaire qu'il ne forme qu'une seule phase avec l'eau. Si du NaCl est rajouté en quantité suffisante pour saturer l'eau, il y aura séparation des deux phases. Il serait intéressant de voir si le pHQNO1 peut s'extraire ainsi à l'acétone. Un millilitre de surnageant polaire du mutant pqsL a été extrait à l'acétone par cette méthode et cet extrait a été donné à un mutant pqsA np. Une concentration de 0,5 mg/l de HQNO a été détectée lors de l'analyse du surnageant par LC-MS.

Il se peut que l'extraction à l'acétone soit peu efficace et que seule une fraction du précurseur ait été récupérée, ce qui explique la faible production de HQNO observée. L'expérience a été répétée quatre fois à partir de nouvelles extractions à l'acétone plus concentrées mais n'a plus jamais généré de HQNO, ce qui pose de gros problèmes de reproductibilité. L'hypothèse d'une contamination ou d'une erreur expérimentale la première fois n'est pas exclue.

Dans le but de produire davantage de précurseur, une extraction à l'acétone a été réalisée sur 50 ml de surnageant du mutant pqsL, en conditions acide, neutre ou basique. Ces extraits ont été donnés au mutant pqsA. Aucune de ces conditions n'a permis de produire du précurseur.

Une extraction à l'acétone a été réalisée avec un surnageant du mutant $pqsC_{np}$ et l'extrait en condition acide a permis de générer une faible quantité de HQNO (Figure 2-42A) par le mutant $pqsA_{np}$, mais aucune production de HHQ (Figure 2-42B). Ce type d'extraction permet donc de récupérer le précurseur du HQNO mais pas celui du HHQ. Il se peut que dans ces conditions, seul le précurseur-NO spécifique à la voie de biosynthèse du HQNO soit extrait, et ce malgré son apparente instabilité. Cela expliquerait pourquoi l'extraction n'est pas efficace dans un mutant pqsL puisqu'il ne produit pas ce précurseur.

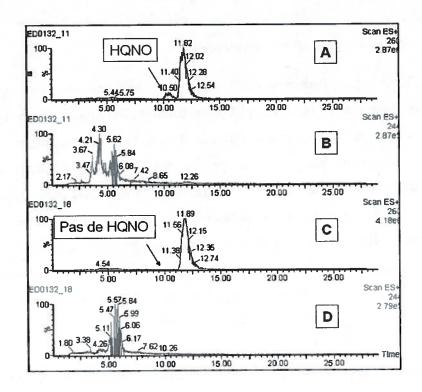


Figure 2-42. Chromatogrammes de la production de HQNO et de HHQ chez le mutant $pqsA^{-}_{np}$ pqsH en présence de l'extrait à l'acétone en condition acide du surnageant de $pqsC_{np}^{-}$. (A) Production de HQNO et (B) de HHQ par $pqsA^{-}_{np}$ pqsH en présence de l'extrait à l'acétone du surnageant du mutant $pqsC_{np}$. (C) Présence de HQNO et (D) de HHQ dans l'extrait à l'acétone.

2.3.3.3 Conclusion sur la voie de biosynthèse des HAQ

En conclusion, je suis parvenue à confirmer l'existence d'un précurseur extracellulaire intervenant dans la biosynthèse du HHQ et un second dans celle du HQNO. Ceux-ci sont des produits des enzymes PqsA et PqsD, qui sont par la suite

convertis par PqsB et PqsC. Dans le cas du HHQ, aucune enzyme supplémentaire n'est nécessaire, tandis que dans le cas du HQNO, l'intervention de l'enzyme PqsL est obligatoire. Par contre, je n'ai pas réussi à déterminer si PqsL agissait en amont ou en aval des enzymes PqsB et PqsC, bien que plusieurs tests suggèrent qu'elle agisse dans une étape intermédiaire entre PqsAD et PqsBC.

Les précurseurs produits de PqsA et PqsD ont été minutieusement caractérisés, même si l'analyse n'a pas permis d'identifier la structure de ces composés extracellulaires et polaires, possédant de nombreuses similitudes. Les résultats présentés ici permettent d'apporter une importante contribution dans la caractérisation de la biosynthèse des HAQ et donneront naissance à plusieurs nouveaux projets au sein du laboratoire.

2.3.4 Étude du rôle des métabolites produits par l'opéron *pqsABCDE* dans le phénotype d'autolyse et d'iridescence

En parallèle à l'étude de la biosynthèse des HAQ, plusieurs expériences ont été réalisées afin d'approfondir les connaissances sur la fonction biologique de ces composés, plus particulièrement concernant leur implication dans le phénotype d'autolyse et d'iridescence des colonies de *P. aeruginosa*.

2.3.4.1 Rôle du HHQ

2.3.4.1.1 Un excès de HHQ couplé à une autolyse mène à l'apparition d'un phénotype d'iridescence sur colonie

Lors du criblage après mutagenèse aléatoire dans un mutant pqsL, j'ai utilisé le phénotype d'iridescence et d'autolyse pour identifier les colonies déficientes dans la production de HHQ (voir section 2.3.3.1.1.1 p. 84). Ce phénotype d'iridescence a également été observé dans un mutant lasR (D'Argenio et al., 2007). Ces deux mutants partagent plusieurs points en commun, dont celui de surproduire le HHQ. Pour vérifier si la surproduction HHQ est impliquée dans l'autolyse et l'iridescence, la morphologie sur gélose de différents mutants produisant plus (lasR, pqsL, pqsH) ou moins (pqsA) de HHQ a été étudiée. Aucune corrélation directe entre l'apparition d'iridescence et la

surproduction de HHQ n'a été observée, puisqu'un mutant pqsH qui accumule davantage de HHQ que pqsL (dix fois plus versus trois fois plus que la souche sauvage, respectivement) présente une moins forte iridescence (Figure 2-43B et E).

Deux explications peuvent accompagner cette observation. D'une part, il se peut que le HHQ génère une certaine toxicité au sein de la cellule, ce qui mènerait à l'autolyse et à l'iridescence caractéristique, mais qu'un facteur présent dans la cellule permettrait d'éliminer cette toxicité. Ce facteur serait dépendant de LasR et de PqsL, puisqu'en absence de ces facteurs l'autolyse et l'iridescence sont exprimées. D'autre part, il est également possible que le HHQ ne soit pas responsable de l'autolyse, et qu'un autre facteur présent dans la cellule l'induise. Dans ce cas, ce facteur serait exprimé – ou s'accumulerait - seulement chez les mutants *lasR* et *pqsL*. Puisque LasR contrôle *pqsL* (D'Argenio *et al.*, 2007), on peut supposer que ce facteur soit dépendant de PqsL. Je privilégie la première explication, car le phénotype d'iridescence n'a jamais été observé en absence d'autolyse, ce qui suggère qu'elle-même puisse être la cause de la lyse cellulaire. La recherche de ce facteur supplémentaire protégeant contre la toxicité du HHQ est présentée au point 2.3.4.2.

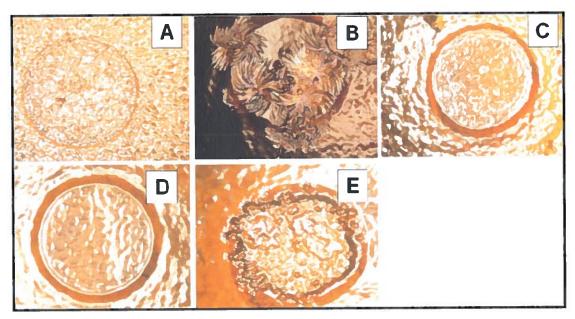


Figure 2-43. Phénotype d'iridescence et d'autolyse sur milieu solide chez différents mutants après 48 heures d'incubation à 37° C.

(A) lasR; (B) pqsL; (C) pqsA; (D) PA14; (E) pqsH. Les photos ont été obtenues avec un appareil photo placé sur un microscope Zeiss Stemi DV4 Stereo, grossissement 8x. Le milieu utilisé est le milieu TSB avec 1.5% d'agar.

Afin de vérifier que l'iridescence visible chez le mutant *lasR* et chez le mutant *pqsL* sont toutes deux composées de HHQ, celle-ci a été récupérée et analysée par spectrométrie de masse. Tel qu'attendu (D'Argenio *et al.*, 2007), une forte concentration de HHQ a été détectée dans les deux solutions. L'iridescence observée dans ces deux mutants est donc de même nature.

En conclusion, le HHQ possède donc un rôle significatif dans l'établissement d'un phénotype iridescent chez certaines souches, bien qu'un simple excès de HHQ ne soit pas suffisant pour créer ce phénotype.

2.3.4.2 Rôle du HQNO

Le rôle connu du HQNO est son activité antibactérienne contre de nombreuses espèces bactériennes. Le HQNO est connu pour cibler la respiration cellulaire, comme cela a été mentionné dans la revue de littérature (point 2.1.5.1). Toutefois, étant donné le phénotype particulier d'autolyse et d'iridescence observable chez un mutant pqsL, il semble clair que cette molécule exerce un rôle au sein même de P. aeruginosa, et que ce rôle intervient dans la survie cellulaire. J'ai donc réalisé quelques expériences en collaboration avec le Dr Luke Hoffman (University of Washington) afin d'identifier le rôle exact du HQNO dans P. aeruginosa, et plus spécifiquement dans l'établissement du phénotype d'autolyse et d'iridescence.

2.3.4.2.1 Lien entre le HQNO et l'apparition d'autolyse et d'iridescence sur milieu solide

2.3.4.2.1.1 L'excès de HHQ est nécessaire mais non suffisant pour générer l'autolyse et l'iridescence : un autre facteur contrôlé par PqsL intervient

Tel que présenté au point 2.3.4.1.1, le phénotype d'autolyse et d'iridescence observé chez les mutants lasR et pqsL est en partie dû à une accumulation de HHQ. Il est également certain que ce seul facteur ne suffit par pour générer le phénotype décrit. Quel facteur supplémentaire affecté dans un mutant pqsL et lasR interviendrait dans l'apparition d'autolyse à pH neutre?

Puisque LasR contrôle la transcription de *pqsL*, une hypothèse est que le facteur responsable de l'autolyse et de l'iridescence dépend de la fonction de cette enzyme ou de l'effet qu'elle induit au niveau de la cellule. Afin de le vérifier, j'ai surexprimé le gène *pqsL* en *trans* chez le mutant *lasR*. Tel qu'attendu, l'iridescence et l'autolyse dans ce mutant sont absentes (Figure 2-44A), alors que la production de HHQ reste élevée dans ces conditions (Figure 2-44B). Ceci démontre qu'une suraccumulation de HHQ est nécessaire mais n'est pas suffisante pour induire le phénotype d'iridescence. De plus, ces résultats indiquent que le facteur supplémentaire à l'excès de HHQ et nécessaire à l'apparition du phénotype étudié dépend bien de PqsL.

Un test similaire a été réalisé avec le mutant *lasR*⁻ exprimant constitutivement *rhlR*. La production de HQNO, faible dans un mutant *lasR*⁻, n'augmente que légèrement en présence de *rhlR*, tandis que le PQS augmente et le HHQ diminue en sa présence, *via* le contrôle de RhlR sur *pqsA* (Xiao *et al.*, 2006b) et *pqsH* (Dekimpe & Déziel, 2009) (Figure 2-44B). Ce mutant perd son phénotype autolytique et iridescent (Figure 2-44A). Ceci s'explique par la diminution de la quantité de HHQ produite ainsi que par la légère augmentation de HQNO.

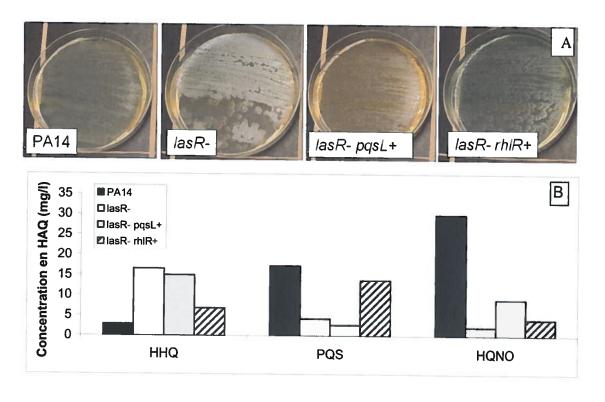


Figure 2-44. Analyse du phénotype sur colonie (A) et de la production des HAQ (B) dans un mutant lasR surexprimant pqsL (pVD08) ou rhlR (pUCPSKrhlR).

2.3.4.2.1.2 Identification du facteur contrôlé par PqsL et impliqué dans l'apparition de l'autolyse et de l'iridescence

L'une des hypothèses proposées est qu'un mutant n'exprimant pas ou peu pqsL, tels que $lasR^-$ ou $pqsL^-$ serait autolytique à cause d'un excès d'oxyde nitrique (NO), toxique pour les bactéries, et que l'autolyse provoquerait la libération de l'excès de HHQ intracellulaire. En effet, les transcriptomes de ces deux mutants révèlent que parmi les gènes les plus surexprimés se retrouvent les gènes nar et nir, codant pour des protéines impliquées dans la dénitrification et dont le produit est le NO (résultats non-publiés, laboratoire L.G. Rahme). Les gènes de détoxification du NO n'étant pas surexprimés dans $pqsL^-$, et même sous-exprimés chez le mutant $lasR^-$, il y aurait alors une accumulation de ce composé toxique, et l'autolyse de la colonie.

Afin de vérifier si une accumulation de NO induit le phénomène d'autolyse, plusieurs mutants connus pour générer un excès ou une carence de NO ont été inoculés sur des géloses. Les mutants nor b (bloqué dans la transformation du NO en N₂O), fhp

(bloqué dans la transformation du NO en N₂O (Koskenkorva *et al.*, 2008)) et *hmgA* (muté dans une dioxygénase se liant au NO pour le détoxifier (Yoon *et al.*, 2007)) accumulent le NO, et pourraient produire de l'autolyse, tandis que *nirQ* (bloqué dans la transformation du NO₂ en NO) devrait ne pas en produire. Toutefois, tous ces mutants présentent un phénotype similaire à celui de la souche sauvage, sans autolyse et sans iridescence. L'accumulation de NO n'induit donc pas l'apparition d'autolyse et d'iridescence.

Les HAQ ont été analysés dans ces mutants, et tous ont une production semblable à celle de la souche sauvage. Afin de vérifier si un excès de HHQ pourrait induire le phénotype d'iridescence et d'autolyse dans ces mutants, ceux-ci ont été inoculés en présence de HHQ (20 mg/l), de PQS (20 mg/l) ou de surnageant de $pqsL^{-}$, et déposés sur la gélose. Même en présence de ces trois solutions, aucune apparition d'iridescence et d'autolyse n'a été observée parmi les mutants qui accumulent le NO.

La recherche du facteur contrôlé par PqsL a abouti à la découverte par le Dr Luke Hoffman (Université de Washington) qu'un ajout de HQNO sur une gélose d'un mutant $pqsL^-$ empêche l'apparition de l'iridescence et de l'autolyse. Ce serait donc le HQNO qui génère un effet de protection contre l'autolyse et l'iridescence.

2.3.4.2.2 Comment le HQNO peut-il « protéger » la bactérie contre l'autolyse ?

2.3.4.2.2.1 Le HQNO ne s'associe pas avec le NO pour le détoxifier

Une hypothèse soulevée par le Dr Hoffman est que le HQNO s'associe au NO afin de le rendre moins toxique pour la bactérie, ce qui expliquerait pourquoi l'autolyse apparaîtrait davantage chez les mutants ne produisant pas ou peu de HQNO. Afin de vérifier cette hypothèse, du NO a été incubé avec du HQNO en conditions abiotiques. Du nitro-HQNO (m/z + 1 = 305) a été détecté par LC-MS, ce qui appuierait cette hypothèse. La réaction est donc chimiquement possible.

Le nitro-HQNO est-il produit naturellement par les bactéries ? Ce produit n'a été détectée dans aucun surnageant de culture bactérienne. Ceci peut s'expliquer par le fait que le nitro-HQNO soit instable dans ces conditions. Pour le vérifier, du nitro-HQNO a été rajouté dans une culture de PA14 et suivi en fonction du temps par LC-MS. Aucune

dégradation du nitro-HQNO n'a été détectée (Figure 2-45), ce qui signifie que la molécule est stable.

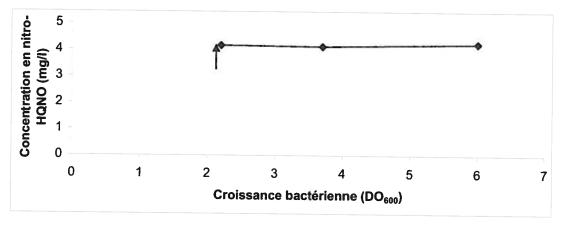


Figure 2-45. Suivi de la stabilité du nitro-HQNO dans une culture de *P. aeruginosa* PA14. 4 mg/l ont été ajoutés (l'ajout est indiqué par une flèche).

La production biologique de nitro-HQNO a été analysée dans un mutant *norD* qui accumule le NO, dans l'espoir d'augmenter la production de ce composé. Dans le même but, du NaNO3 a également été ajouté dans la culture. Aucun nitro-HQNO n'a été détecté dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que le nitro-HQNO n'est pas une molécule produite naturellement chez *P. aeruginosa* et que le HQNO ne sert pas à détoxifier le NO en le complexant.

2.3.4.2.3 D'autres facteurs influencent l'apparition d'iridescence et d'autolyse

Le HQNO n'est pas la seule molécule capable d'éliminer l'apparition de l'autolyse et de l'iridescence. Un disque imbibé de H_2O_2 (Figure 2-46) ou de nitrites (communication personnelle du Dr. Luke Hoffman) posé sur un tapis du mutant pqsL ou lasR bloque l'apparition de ce phénotype. En effet, on peut observer que les bactéries les plus proches du disque de H_2O_2 ne présentent aucune iridescence et que l'iridescence est seulement visible à une distance plus éloignée de la source de peroxyde, tant dans lasR que dans pqsL.

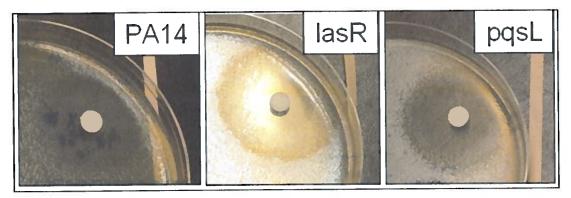


Figure 2-46. Élimination de l'iridescence en présence de H2O2.

Ces résultats démontrent que le HQNO est une molécule dont le rôle dépasse celui de simple agent antibiotique. Des études plus poussées sont nécessaires afin de caractériser le rôle de biologique du HQNO chez *P. aeruginosa*.

2.4 Discussion et perspectives du projet

Dans ce chapitre, j'ai présenté les différentes études que j'ai effectuées liées à la production et au rôle des HAQ. Cette famille de molécules produites par P. aeruginosa regroupe plus d'une cinquantaine de composés (Lépine et al., 2004). Parmi ceux-ci, les mieux caractérisés sont le HHQ, le PQS et le HQNO. Les deux premiers ont été identifiés comme des molécules-signal, capables de se fixer sur le régulateur transcriptionnel MvfR pour ainsi activer son régulon (Déziel et al., 2005; Diggle et al., 2007; Xiao et al., 2006a). Quant à la troisième molécule, le HQNO, elle est connue pour ses propriétés antimicrobiennes, ciblant principalement la respiration des bactéries à Gram positif (Lightbown, 1954; Lightbown & Jackson, 1956; Machan et al., 1991; Machan et al., 1992; Yoshikawa et al., 1999). Ces molécules sont toutes produites par un opéron, nommé pqsABCDE, à partir d'acide anthranilique (Calfee et al., 2001; Déziel et al., 2004; Ritter & Luckner, 1971). L'acide anthranilique est lui-même produit à partir de plusieurs voies métaboliques, dont celles du tryptophane et de la kynurénine (Farrow & Pesci, 2007). Certains HAQ, comme le HHQ et le PQS, nécessitent l'action de gènes supplémentaires, respectivement pqsH (Gallagher et al., 2002) et pqsL (Lépine et al., 2004), afin d'être synthétisés.

De nombreuses expériences ont été réalisées en collaboration avec plusieurs laboratoires et ont mené à des publications auxquelles j'ai participé sur la biosynthèse du DHQ (Lépine et al., 2007), sur l'étude des inhibiteurs de la voie de biosynthèse des HAQ (Lesic et al., 2007) et sur l'étude des molécules-signal de B. thailandensis et B. ambifaria (Vial et al., 2007; Vial et al., 2008; Vial et al., 2010). La discussion présentée ici se concentrera principalement sur le cœur de mon projet HAQ, c'est-à-dire sur les nouvelles méthodes de criblage des mutants affectés dans la biosynthèse des HAQ, sur la voie de biosynthèse du HHQ et du HQNO, et sur le rôle de ces HAQ dans le phénotype d'autolyse et d'iridescence.

2.4.1 Du rôle de l'oxygène dans la production des HAQ

Les HAQ sont impliqués dans la virulence de *P. aeruginosa*. Il a été prouvé que ceux-ci sont produits par les bactéries présentes dans les poumons des individus atteints de fibrose kystique, et que les gènes *phnAB* et *pqsABCDE* sont ceux qui sont le plus activés dans le *sputum* des patients (Collier *et al.*, 2002; Guina *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2005). Or, les conditions dans lesquelles se trouvent les bactéries colonisant ce milieu restent sujet à controverse. Plusieurs études ont postulé que la colonisation des poumons par *P. aeruginosa* se fait en conditions d'anaérobie (Jewes & Spencer, 1990; Rogers *et al.*, 2004; Worlitzsch *et al.*, 2002), bien que cette affirmation ne fasse pas l'unanimité (Alvarez-Ortega & Harwood, 2007).

L'analyse de la production des HAQ en aérobie et en anaérobie a été réalisée afin de caractériser leur production dans chacune de ces conditions (Figure 2-14 p. 77 et Figure 2-15, p. 78). Si le HHQ est produit en quantités similaires en milieu aérobie et anaérobie, le HQNO et le PQS, majoritaires en présence d'oxygène, deviennent fortement minoritaires en conditions dénitrifiantes. Ces résultats sont en accord avec une publication subséquente qui rapporte la faible production de PQS dans ces conditions (Toyofuku et al., 2008).

Puisque le PQS est retrouvé dans le *sputum* des patients atteints de fibrose kystique (Collier *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2005) et que l'on vient de démontrer que le PQS n'est abondant qu'en condition aérobie, cela suggère que les souches bactériennes sont exposées à suffisamment d'oxygène dans les poumons des patients. Néanmoins, la

quantification du PQS dans les échantillons de *sputum* présente plusieurs faiblesses. En effet celui-ci a été mesuré à partir de plaques de chromatographie sur couche mince (Collier et al., 2002; Palmer et al., 2005), ce qui ne constitue pas une méthode quantitative fiable. De plus, étant donné que le PQS a été extrait et concentré, sa quantité absolue n'apporte que peu d'information. Il aurait été beaucoup plus instructif de le comparer à la production de HHQ, ce qui aurait permis de déterminer de manière plus convaincante si le *sputum* doit être considéré comme milieu aérobie ou anaérobie. Malheureusement, aucune des deux études ne s'est intéressée à mesurer la production de HHQ dans celui-ci. Dans notre laboratoire, une toute nouvelle méthode d'extraction des HAQ à partir de *sputum* est en cours d'optimisation. Des résultats préliminaires suggèrent que le HHQ serait le HAQ le plus abondant dans ce milieu, ce qui pencherait en faveur de l'hypothèse d'un milieu peu ou pas approvisionné en oxygène.

2.4.2 Élaboration de nouveaux protocoles de sélection des mutants affectés dans la production des HAQ

2.4.2.1 Sélection à grande échelle

La voie de biosynthèse des HAQ étant le sujet principal de ce chapitre, il a été question des enzymes nécessaires pour la transformation de l'acide anthranilique en HAQ. Deux criblages par mutagenèses aléatoires ont été réalisés pour identifier les gènes impliqués dans la biosynthèse du HHQ. Le critère de sélection des mutants affectés dans cette production était la disparition du phénotype d'iridescence et d'autolyse dans un mutant pqsL ou chez la souche sauvage cultivée en milieu acide (pH 6,5).

Un criblage à la recherche de colonies non-iridescentes avait déjà été réalisé dans un mutant pqsL auparavant (D'Argenio et al., 2002), afin de comprendre l'origine de ce phénotype. Les gènes identifiés par ce criblage sont impliqués dans la biosynthèse du PQS, ce qui confirme le rôle des HAQ dans l'apparition de ce phénotype. Si les deux méthodes ont fourni des résultats très positifs et une efficacité similaire, la mutagenèse en milieu acide sera la méthode de choix, afin d'éviter toute altération inutile du génome qui pourrait biaiser indirectement les phénotypes observés. L'alternative novatrice du milieu acide vaut donc la peine d'être appliquée.

Jusqu'à présent, les mutants connus pour être déficients dans la production de HAQ ont été isolés à partir de criblages de mutants ne produisant plus de pyocyanine (Gallagher et al., 2002) ou dont la virulence est affectée dans un modèle de plante (Rahme et al., 1997). Toutefois, aucun criblage n'avait encore été réalisé dans le but d'isoler spécifiquement des mutants déficients dans la production de HHQ. Les conditions mises au point dans ce projet rendent maintenant la chose possible.

2.4.2.2 Sélection à moyenne et petite échelle

2.4.2.2.1 Corrélation entre production de pyocyanine et production de HHQ

2.4.2.2.1.1 L'absence de pyocyanine est un bon facteur pour identifier des mutants affectés dans leur production de HHQ

Lors des deux criblages réalisés pour identifier les souches ne produisant plus de HHQ, deux catégories de transposants non autolytiques et non iridescents ont été identifiées. La première regroupe les transposants ne produisant plus de HHQ (Tableau 2-1 p. 87 et Tableau 2-2 p. 91) et la seconde ceux dont la production n'a pas été affectée (Tableau 2-1 p. 87 et Tableau 2-3 p. 94). Une seconde sélection a donc été requise pour ne conserver que les transposants incapables de produire le HHQ. Deux méthodes d'analyse de la production de HHQ à moyenne échelle ont été testées afin d'identifier les mutants affectés dans la production de ce métabolite parmi les souches non-autolytiques et non-iridescentes. La première méthode se base sur le suivi de la production de la pyocyanine, un pigment sécrété par P. aeruginosa dont l'expression est régulée par le système MvfR-PQS via PqsE (Déziel et al., 2005; Gallagher et al., 2002). Une corrélation directe entre l'absence de pyocyanine et la faible production ou l'absence de production de HHQ a été démontrée avec succès, à l'exception de deux mutants dont il sera question ci-dessous. Cette méthode nécessite de cultiver chaque mutant en milieu liquide et de sélectionner qualitativement les mutants ne présentant pas la couleur verte caractéristique qu'arbore P. aeruginosa lorsqu'elle produit la pyocyanine. Toutefois, étant donné le grand nombre de gènes intervenant dans la régulation de ce pigment (Carty et al., 2006; Latifi et al., 1995; Liang et al., 2008; Rampioni et al., 2007; Suh et al., 1999; Whiteley et al., 2000; Xu et al., 2005), il est évident que son absence n'est pas toujours

liée à la production des HAQ. Il s'agit néanmoins d'une méthode efficace pour sélectionner des mutants affectés dans la voie de biosynthèse des HAQ parmi plusieurs dizaines de candidats. C'est d'ailleurs cette méthode qui a permis d'identifier fortuitement les gènes de biosynthèse du PQS (Gallagher et al., 2002).

2.4.2.2.1.2 Le cas particulier des mutants VD10.41 et pqsLVD5.79

Lors des criblages réalisés pour ce projet, deux mutants (VD10.41 et pqsLVD5.79) ne produisant plus aucun HHQ ont montré une production de pyocyanine semblable à celle de la souche sauvage. La combinaison de ces deux phénotypes n'a jamais été rapportée auparavant. Il est fréquent d'identifier des mutants produisant des HAQ mais pas de pyocyanine, tels que les mutants pqsE ou rhlR (Brint & Ohman, 1995; Diggle et al., 2003; Farrow et al., 2008; Gallagher et al., 2002). Par contre l'inverse est surprenant, puisque les HAQ sont nécessaires à l'activation de PqsE, qui lui-même est nécessaire pour l'expression des gènes phz menant à la production de pyocyanine (Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010). En absence de HHQ et de PQS, la transcription de l'opéron est inactivée et PqsE n'est pas exprimé, ce qui empêche toute production de pyocyanine. L'absence de HAQ dans ces deux souches a été confirmée plusieurs fois.

Le mutant pqsLVD5.79 n'a pas pu être séquencé, malgré cinq tentatives. Quant au mutant VD10.41, il possède une mutation au début du gène pqsA (voir p. 92). Cette insertion doit normalement bloquer ou du moins fortement diminuer la transcription de pqsE (autant par la perte de HAQ que par une polarité sur les gènes en aval dans l'opéron), ce qui devrait mener à une diminution drastique de la production de pyocyanine, alors que ce mutant en produit autant que la souche sauvage. Le reste du transposon a également été éliminé afin de limiter son incidence sur le phénotype du mutant. Seules 63 pb ont été conservées pour maintenir la mutation. Malgré l'élimination presque complète du transposon, le phénotype est resté inchangé (voir p. 92).

Nous avons dans le laboratoire un mutant pqsA, originaire de la banque non redondante de PA14 (Liberati et al., 2006) dont l'insertion transpositionnelle (située sur le génome de PA14 entre les nucléotides 4571357 et 4571358) se situe à 5 nucléotides de l'insertion du mutant 10.41 (située au nucléotide 4571352 sur le génome). Or le mutant de la banque ne produit aucune pyocyanine. La mutation VD10.41 a été transférée chez la

souche sauvage qui a reproduit le même phénotype (présence de pyocyanine et absence de HAQ), ce qui suggère que la présence du transposon ou d'au moins une fraction de celui-ci au niveau de pqsA est responsable du phénotype. Le même transfert dans un mutant pqsE n'a toutefois pas permis une production de pyocyanine. Ce résultat confirme que (i) PqsE reste indispensable à la production de pyocyanine en présence de la mutation 10.41 et que (ii) le gène pqsE doit être transcrit dans ce mutant malgré l'absence de HHQ pour activer la transcription de l'opéron. Cette dernière affirmation devra toutefois être validée ultérieurement, par RT-PCR par exemple.

Il est surprenant de constater que PqsE reste actif en absence de production de HAQ, et donc avec une activation de la transcription de l'opéron théoriquement nulle. Cette constatation est en contradiction avec le fait que les mutants de l'opéron ne produisent pas de pyocyanine, à moins d'exprimer pqsE de manière constitutive (Farrow et al., 2008; Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010), d'ajouter du HHQ ou du PQS dans le cas des mutants non polaires contenant le gène pqsE intact (Hazan et al., 2010), ou d'exprimer constitutivement les gènes de biosynthèse de la pyocyanine ou l'activateur direct, RhlR (Hazan et al., 2010) (bien que ce dernier point n'ait pas été observé dans notre laboratoire).

L'expression de pqsE chez le mutant VD10.41, nécessaire pour la production de pyocyanine observée, reste néanmoins en accord avec les résultats montrant que les mutants mvfR produisent encore un peu de HAQ (Tableau 2-1) et que les mutants pqsB et pqsC synthétisent encore du DHQ en absence de HHQ ou de PQS. Il semble donc que l'opéron pqsABCDE puisse être légèrement activé en absence de ce régulateur ou de ses ligands. Toutefois, aucun mutant de l'opéron, polaire ou non polaire, ne présente une production de pyocyanine similaire à celle rencontrée dans les mutants pqsL VD5.79 et VD10.41 en absence de HHQ ou de PQS. L'étude de ces deux mutants devra donc être approfondie pour apporter les éclaircissements nécessaires et comprendre le phénotype observé.

2.4.2.2.2 Corrélation entre fluorescence et production de HHQ

P. aeruginosa produit naturellement plusieurs composés fluorescents, dont le principal est la pyoverdine (Leisinger & Margraff, 1979). Bien que leurs propriétés

fluorescentes n'aient jamais fait l'objet d'une étude approfondie, les HAQ émettent aussi de la lumière lorsqu'ils sont soumis à une excitation d'une longueur d'onde de 365 nm. Cette propriété est d'ailleurs utilisée couramment pour purifier le PQS à partir des plaques de chromatographie en couche mince (Pesci et al., 1999).

La méthode choisie pour identifier rapidement les mutants déficients dans la production de HHQ se base sur ces propriétés de fluorescence. Pour éviter une interférence de la fluorescence par la présence de la pyoverdine, une extraction rapide des molécules non polaires au moyen d'un solvant organique est nécessaire. Ainsi, la phase organique obtenue ne contient que les HAQ, ce qui facilite l'interprétation des données de fluorescence. Cette méthode est plus fiable encore que le suivi de la pyocyanine, puisque l'on suit directement la fluorescence des molécules ciblées. Elle a donc été retenue comme méthode semi-quantitative de détection des HAQ à grande échelle. Une fois la sélection terminée, la production de HHQ doit être confirmée et quantifiée par LC-MS.

Ces méthodes de sélection de mutants déficients dans la production de HHQ ont permis de démontrer que les gènes *pqsABCD* sont les seuls gènes indispensables pour permettre la biosynthèse de ce métabolite. Cette observation fait l'objet du point de discussion suivant.

2.4.3 PqsA, PqsB, PqsC, PqsD, PqsH et PqsL sont les seules enzymes nécessaires à la biosynthèse des HAQ

Après le criblage de plus de 72 000 colonies selon les paramètres énoncés plus haut, 147 transposants sans défaut de croissance ont présenté une absence d'autolyse et d'iridescence, signe d'une éventuelle déficience dans la biosynthèse du HHQ. Parmi ceux-ci, trois catégories ont été identifiées. Ces catégories regroupent les transposants dont la production de HHQ est (i) non affectée, (ii) partiellement affectée et (iii) totalement inhibée. Toutefois, dans le but de limiter les recherches et pour se limiter dans un premier temps aux gènes absolument requis pour la biosynthèse du HHQ, l'accent a été principalement mis sur la dernière catégorie. En effet, lors de la sélection des mutants

non fluorescents, seuls les mutants ne produisant plus du tout de HHQ étaient retenus pour analyse.

Sur les 19 transposants séquencés présentant une production de HHQ inchangée ou partiellement diminuée, deux de ceux-ci possèdent une mutation dans le gène ou dans le promoteur de mvfR et plusieurs autres ont été bloqués dans des gènes liés à la respiration cellulaire. Ces gènes ne sont pas essentiels à la biosynthèse du HHQ puisque celui-ci est encore totalement ou partiellement produit. Chez les mutants où la production de HHQ est partiellement affectée, il est probable qu'une voie de régulation des HAQ ait été affectée par le transposon, comme c'est le cas pour les transposons localisés dans le gène mvfR. Quant à ceux dans lesquels la production de HHQ reste inchangée, la mutation doit probablement affecter un facteur autre que le HHQ impliqué dans le phénotype d'autolyse et d'iridescence, comme il en sera question à la section 2.4.4.2.2, p. 155.

Sur les 36 transposants ne produisant pas de HHQ qui ont été séquencés, tous ont présenté une mutation dans les gènes *pqsABCD* ou *mvfR*. La forte redondance rencontrée suggère qu'il n'existe aucun autre gène dans le génome de *P. aeruginosa* PA14 requis pour la biosynthèse du HHQ. Le nombre élevé de clones ayant une insertion identique au nucléotide près (

Figure 3-18) peut être expliqué par deux facteurs. Lors de l'étape de conjugaison, les cellules ont été incubées durant une douzaine d'heures. Il se peut que plusieurs transposants aient eu le temps de se diviser, ce qui génère de multiples clones possédant une insertion transpositionnelle au même endroit. Cependant, plusieurs mutants identiques sont issus de mutagenèses réalisées séparément (VD9 et VD10). Il est donc également possible que le transposon utilisé ait des sites préférentiels d'insertion dans le génome, appelés communément « points chauds » (hot spots).

Ces données ont donc permis de s'assurer que toutes les enzymes impliquées dans la synthèse du noyau quinoline du HHQ ont été identifiées, c'est-à-dire PqsA, PqsB, PqsC et PqsD. Étant donné qu'aucune enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides gras n'a été identifiée par les criblages, il est probable que la synthèse de la chaîne acyle du HHQ soit prise en charge par plusieurs voies enzymatiques parallèles, ou par une voie

générale essentielle à la viabilité de la bactérie. Les expériences par mutagenèse aléatoire menées ici n'ont donc pas permis de les identifier.

La voie de biosynthèse du PQS est essentiellement identique à celle du HHQ, puisque le HHQ est le précurseur direct de cette molécule (Gallagher et al., 2002). Les criblages réalisés dans ce projet permettent donc d'affirmer que la production du noyau quinoline du PQS ne nécessite aucune autre enzyme en dehors de (i) PqsABCD pour produire du HHQ et de (ii) PqsH pour rajouter un groupement hydroxyle sur la position 3 de ce dernier.

La production de HQNO nécessite la présence des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD. Néanmoins, elle requiert une enzyme supplémentaire, PqsL, responsable de la modification du groupement azoté du noyau quinoline en N-oxyde (-NO) (Lépine et al., 2004). Aucun criblage n'a été réalisé en vue d'identifier d'autres gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse, à cause du manque de critères d'identification des mutants d'intérêt. Toutefois, il est peu probable que d'autres enzymes soient identifiées, car les cinq déjà connues sont théoriquement et biochimiquement suffisantes pour transformer l'acide anthranilique en HQNO (Figure 2-7). Cependant, bien qu'elle utilise les mêmes enzymes, la voie de synthèse du HQNO diffère de celle du HHQ, puisque ce dernier n'est pas l'un de ses précurseurs. Ainsi, deux voies métaboliques semblent nécessaires à la synthèse des HAQ: celle du HHQ et du PQS, et celle du HQNO. Leur degré de chevauchement a fait partie de ce travail et sera discuté au point 2.4.3.3.5, p. 143.

2.4.3.1 Analyse de la biosynthèse des produits de l'opéron pqsABCDE

Une partie importante de ce travail a porté sur la caractérisation de la voie de biosynthèse des produits de l'opéron *pqsABCDE*. Les métabolites produits par celui-ci ont été investigués, et l'une des grandes avancées de ces travaux est la découverte de molécules extracellulaires relativement polaires et produites par les enzymes PqsA et PqsD.

2.4.3.2 L'organisation structurelle de l'opéron pqsABCDE diffère de sa séquence fonctionnelle

Une raison pour laquelle les produits extracellulaires de PqsA et PqsD ont tardé à être découverts est due au fait que les enzymes de l'opéron n'agissent pas dans la

séquence dans laquelle ils sont codés. En effet les travaux présentés ici démontrent que PqsD agit avant PqsB et PqsC dans la voie de biosynthèse du HHQ (voir section 2.3.3.1.2.4 p. 99) et du HQNO (voir section 2.3.3.2.2.1 p. 114). Dans ce genre de situation, l'utilisation de mutants non polaires devient essentielle dans la recherche de produits intermédiaires. Cette organisation structurelle différente de l'organisation fonctionnelle est relativement commune. On la retrouve entre autres dans l'opéron de biosynthèse des phénazines, *phzABCDEFG* (Mavrodi *et al.*, 1998).

2.4.3.3 Plusieurs produits de PqsA et PqsD ont été identifiés

2.4.3.3.1 Des produits de l'activité de PqsA et PqsD sont moins polaires que les HAQ

Une raison pour laquelle le DHQ n'a été découvert que récemment est due à ses propriétés plus polaires que celles des HAQ (Lépine et al., 2007). Les méthodes de LC/MS, ainsi que les techniques d'extraction à l'acétate d'éthyle mises au point pour la détection et l'analyse des HAQ ont été optimisées pour l'identification de composés moins polaires et n'ont donc pas permis la détection du DHQ (Déziel et al., 2004).

C'est, au moins en partie, pour cette même raison que les précurseurs du HHQ (pHHQ) et du HQNO (pHQNO1) n'ont pas été identifiés plus rapidement. L'analyse du surnageant des différents mutants était optimisée pour les conditions de détection de l'acide anthranilique et des HAQ, en supposant qu'un produit intermédiaire posséderait les mêmes propriétés. C'est en cherchant les intermédiaires des HAQ que le DHQ a été fortuitement découvert (Lépine et al., 2007). Il a fallu près de deux années pour trouver les conditions de détection pour ce composé, et des recherches intensives sont encore en cours pour déterminer celles qui permettront d'identifier les précurseurs du HHQ et du HQNO.

2.4.3.3.2 Mise au point des paramètres de détection des produits de PqsA et PqsD

De nouvelles colonnes de chromatographie, adaptées pour la séparation de produits plus polaires, pourraient être utilisées pour identifier les métabolites et intermédiaires trop polaires. Par exemple, la colonne HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) s'utilise avec une phase mobile hydrophobe. Elle est composée d'une phase stationnaire hydrophile neutre. Les solutés sont donc élués selon un gradient d'hydrophobicité croissant. Elle est particulièrement recommandée pour la séparation des molécules polaires. Elle diffère de la colonne Zorbax C8 utilisée couramment pour la détection des HAQ (Déziel et al., 2004; Lépine et al., 2003; Lépine et al., 2004). Celle-ci possède une phase stationnaire hydrophobe compatible avec une phase mobile de méthanol, d'eau ou d'acétonitrile, et recommandée pour la séparation de molécules plus hydrophobes.

Les conditions de synthèse du pHHQ ont été présentées dans ce chapitre. Pour la suite de ces travaux, ces paramètres devront être mis en application pour optimiser les chances de détection de ces composés. Les analyses devraient être effectuées sur le milieu extracellulaire d'un mutant pqsB ou pqsC non polaire, nourri au PQS (par ex. 20 mg/l) afin d'activer l'opéron et à l'acide anthranilique tétradeutéré afin de générer des intermédiaires marqués. Les cultures devraient être arrêtées en fin de phase logarithmique et les conditions de détection adaptées à la recherche de molécules polaires. Ces paramètres devraient faciliter la découverte de nouveaux composés impliqués dans la voie de synthèse des HAQ.

2.4.3.3.3 Il existe probablement plus d'un précurseur des HAQ produit de PqsA et PqsD

Le nombre de composés intermédiaires de la voie de biosynthèse des HAQ produits par PqsA et PqsD ne se limite pas au DHQ et au pHHQ. Pour rappel, le HHQ n'est que le représentant majoritaire de toute une famille de molécules produites par PqsABCD et qui ont été caractérisées en 2004 (Lépine *et al.*, 2004). La famille des HAQ regroupe près d'une cinquantaine de molécules et congénères différant les un des autres par la longueur et le degré d'insaturation de leur chaîne aliphatique, ou par l'ajout d'un groupement NO

ou hydroxyle au niveau du noyau quinoline. Il est donc possible que plus d'un précurseur soit nécessaire pour leur synthèse.

La future caractérisation du pHHQ est nécessaire pour mesurer l'étendue de cette nouvelle famille de précurseurs des HAQ. Selon l'étude structurelle du DHQ et la fonction prédite des enzymes PqsB et PqsC (voir p. 51), il semble plus plausible que le précurseur produit de PqsA et PqsD ne possède pas encore de chaîne aliphatique, et que celle-ci soit ajoutée par la suite *via* la fonction de PqsB et PqsC. Dans ce cas, tous les HAQ ayant un noyau quinoline identique et ne différant que par leur chaîne aliphatique auront un même précurseur. Dans le cas contraire, si la chaîne aliphatique est déjà présente, il y aura autant de précurseurs que de chaînes aliphatiques variées. Des expériences ont été réalisées afin de déterminer la présence ou l'absence d'une chaîne aliphatique au niveau du précurseur (voir section 2.3.3.1.3.6 p. 109). Celles-ci n'ont pas apporté de preuves concluantes et devront être optimisées afin de répondre à la question.

Le noyau quinoline des HAQ présente peu de modifications au sein de la famille des HAQ. Le groupement hydroxyle typique du PQS et des HAQ apparentés est une modification qui a lieu après la biosynthèse du HHQ. Il n'existe donc pas de précurseur produit de PqsA et PqsD qui possède un noyau quinoline hydroxylé en position 3. Il n'en est pas de même pour le groupement NO qui remplace l'azote du noyau quinoline, puisque celui-ci n'est pas rajouté directement sur le HHQ. Il est donc possible que le HQNO possède un précurseur produit de PqsA et PqsD différent du pHHQ.

2.4.3.3.4 Le substrat de PqsL est-il un produit de PqsA et PqsD?

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que l'enzyme PqsL possède un substrat, que l'on retrouve dans le surnageant des mutant $pqsC_{np}$ et pqsL, sur lequel il viendrait modifier le groupement azoté du noyau quinoline pour générer un groupement – NO. Il existe donc un intermédiaire identifiable dans la biosynthèse du HQNO. J'ai confirmé qu'au moins PqsA et PqsD sont nécessaires pour sa production (voir section 2.3.3.2.2.2 p. 115), ce qui confirme que ces deux enzymes agissent en amont de PqsL.

Selon ces résultats, deux hypothèses ont été proposées. D'une part, il est possible que PqsL agisse sur un produit de PqsA et PqsD, et que l'intermédiaire produit soit utilisé

comme substrat par PqsB et PqsC. Une seconde hypothèse est que le substrat de PqsL soit un produit de PqsABCD, qui serait différent du HHQ, et qui serait modifié pour donner le HQNO. Toutefois, les deux expériences réalisées pour identifier la bonne hypothèse ont donné des résultats ambigus. Le HQNO est produit lorsque le surnageant de pqsL est donné à un mutant pqsA non polaire mais pas à un mutant pqsC non polaire. Cela suggère que PqsL agit en amont de PqsC, et supporte la 1ère hypothèse. Paradoxalement, le surnageant d'un mutant pqsC non polaire ne permet pas au mutant pqsL de produire du HQNO, ce qui empêche de confirmer l'hypothèse. Cette incohérence peut s'expliquer par une possible instabilité du produit de PqsL dans le surnageant du mutant pqsC, mais les expériences visant à limiter le temps entre la production et l'utilisation de cet intermédiaire n'ont pas été plus concluantes.

Néanmoins, les propriétés du substrat de PqsL, le pHQNO1, étudiées au point 2.3.3.2.3.3 p. 119, ont davantage de similitudes avec les produits connus de PqsA et PqsD (polarité, paramètres de détection par LC-MS différents de celles des HAQ), qu'avec les HAQ. Si le précurseur ne possède pas de chaîne aliphatique, cela appuierait davantage l'hypothèse d'un substrat de PqsL produit de PqsA et PqsD. Par la suite, la chaîne aliphatique serait ajoutée sur l'intermédiaire par l'action des enzymes PqsB et PqsC, prédites pour être des beta-céto-acyl-acyl carrier protein synthases. Ceci doit encore être testé expérimentalement.

L'hypothèse d'un substrat extracellulaire pour PqsL a été testée au moyen d'un système hétérologue (voir section 2.3.3.2.1.1, p. 112). Les gènes mvfR (pDN18mvfR) et pqsABCD (pLG12) ont été exprimés en trans dans une souche d'E. coli en présence d'une seconde souche exprimant pqsL (pVD08). En plus du fait que la co-culture n'a pas généré de HQNO, la première souche, normalement capable de produire du HHQ, n'a plus été capable d'en produire en présence de la seconde souche. Ces observations suggèrent que l'expression de pqsL ou la production de HQNO ou de son précurseur pourrait affecter E. coli. Lors d'une seconde expérience, le surnageant d'un mutant pqsL a été utilisé pour cultiver la souche d'E. coli exprimant pqsL (pVD08). De gros problèmes de croissance ont été observés. Ceci est probablement dû à différentes toxines que sécrète P. aeruginosa et qui inhibent la croissance d'E. coli (Lee et al., 2010). Au vu de ces différents obstacles, il serait judicieux de répéter ces expériences en utilisant une

autre bactérie-hôte pour l'expression des gènes de biosynthèse du HQNO. Ces expériences pourraient être répétées dans *P. fluorescens* par exemple, qui ne produit pas naturellement de HAQ. Cette souche pourrait être moins sensible aux différents métabolites potentiellement toxiques produits par *P. aeruginosa*, puisqu'elle lui est davantage apparentée.

2.4.3.3.5 Le HQNO et le HHQ ont-ils un intermédiaire commun produit de PqsA et PqsD ?

Lors de l'étude du substrat de PqsL, le pHQNO1, j'ai constaté que ses propriétés sont très semblables à celles du pHHQ. On les retrouve dans les mêmes fractions lors d'une séparation chromatographique, ils sont tous deux présents dans le milieu extracellulaire des mutants qui les accumulent et sont produits au même moment lors de la croissance cellulaire. Étant donné ces grandes similarités, j'ai affiné l'hypothèse proposée à la figure Figure 2-38. En accord avec les résultats présentés plus haut, je propose que pHHQ et le pHQNO1 soient une seule et même molécule. Par la suite, celleci peut être soit directement convertie par PqsB et PqsC pour donner du HHQ, soit transformée par PqsL pour générer le pHQNO2b. Celui-ci serait par la suite utilisé comme substrat pour les enzymes PqsB et PqsC afin de produire du HQNO (Figure 2-47).

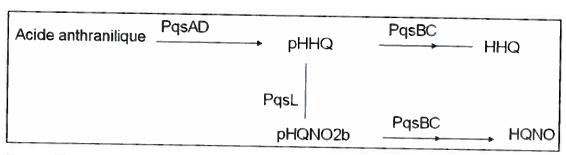


Figure 2-47. Schéma proposé de biosynthèse du HHQ et du HQNO chez P. aeruginosa.

Ainsi, dans un mutant pqsL, la biosynthèse du HQNO serait stoppée au niveau de l'intermédiaire commun entre le HHQ et le HQNO, c'est-à-dire le pHHQ. Cette hypothèse expliquerait la raison pour laquelle un mutant pqsL produit davantage de HHQ, puisque le pHHQ est détourné pour produire le HHQ.

Cette hypothèse est prometteuse sur de nombreux points. D'une part, elle est en accord avec l'hypothèse que le substrat de PqsL est un produit de PqsA et PqsD seulement. De plus, elle est en accord avec le fait que le HHQ n'est pas un précurseur du HQNO et qu'en absence de PqsL la production de HHQ et de PQS augmente nettement (voir Tableau 2-3 et (D'Argenio et al., 2002)). En effet, la totalité du précurseur est alors dédiée à la production du HHQ et aucun pourcentage n'est dévié vers la voie du HQNO dans ces conditions. Elle expliquerait les ressemblances observées dans les propriétés des précurseurs du HHQ et du HQNO (voir section 2.3.3.2.3.3, p. 119). Elle est également en accord avec l'observation selon laquelle PqsL agit après PqsA et que les quatre enzymes de biosynthèse des HAQ de l'opéron pqs sont impliquées dans la production de HQNO. La seule faiblesse de cette idée est l'accumulation observée du pHQNO1 chez le mutant pasL. Si le pHQNO1 est également le pHHQ, celui-ci peut alors directement être utilisé par PqsB et PqsC pour générer du HHQ. Il ne devrait donc pas s'accumuler. Le résultat observé peut toutefois s'expliquer par le fait que les enzymes PqsB et PqsC pourraient être saturées par la grande quantité de pHHQ disponible. Ceci pourrait être vérifié en surexprimant pqsB et pqsC dans ce mutant afin de déterminer si l'accumulation du pHONO1 diminue.

Pour prouver cette hypothèse, il faudra démontrer la présence d'un précurseur modifié possédant un noyau quinoline N-oxyde (ou pHQNO2b). Ceci a été tenté durant mon projet. En donnant un extrait à l'acétone d'un surnageant d'un mutant $pqsC_{np}$ à un mutant $pqsA_{np}^-$ pqsH, je suis parvenue à produire une faible quantité HQNO sans aucune production de HHQ (Figure 2-42). Cette faible production n'a pas lieu en présence d'un extrait de surnageant du mutant pqsL (à l'exception d'une fois en quatre tentatives, mais la thèse de la contamination semble la plus plausible, voir section 2.3.3.2.3.4 p. 121). Ceci suggère que le pHQNO2b, absent dans les cultures du mutant pqsL et présent dans celles du mutant $pqsC_{np}$, a été extrait à l'acétone, au contraire du précurseur commun au HHQ et au HQNO, le pHHQ. Par contre, la quantité de HQNO produite est faible, et plusieurs autres expériences n'ont pas permis de générer du HQNO dans un mutant pqsL à partir du surnagent du mutant $pqsC_{np}$. La raison proposée est que le pHQNO2b soit fortement instable. D'autres expériences sont donc requises pour valider ces résultats préliminaires.

2.4.3.3.6 Remise en contexte : activités enzymatiques de PqsA et PqsD dans la biosynthèse des HAQ

2.4.3.3.6.1 La première étape de synthèse des HAQ par PqsA a été caractérisée

Quelques publications récentes se sont penchées sur les fonctions enzymatiques de PqsA et PqsD (Bera et al., 2009; Coleman et al., 2008; Lépine et al., 2007; Zhang et al., 2008). PqsA est une coenzyme A ligase dont le substrat est l'acide anthranilique. En présence d'ATP et de coenzyme A, elle génère de l'anthraniloïl-CoA (Coleman et al., 2008). Dans cette étude, plusieurs analogues de l'acide anthranilique ont été utilisés pour déterminer la spécificité du substrat de PqsA. Tous les acides carboxyliques aromatiques testés ont été utilisés comme substrat par cette enzyme. En présence de dérivés de l'acide anthranilique méthylés, chlorés ou fluorés, tels que le 4-CABA et le 6-FABA, PqsA est donc capable de générer des thioesters-CoA, ce qui interrompt la production des HAQ et inactive l'expression de tous les gènes régulés par MvfR (Lesic et al., 2007). L'inhibition de la voie de biosynthèse des HAQ par ces dérivés peut être due à la compétition avec l'acide anthranilique pour le site de PqsA, ou au blocage des enzymes agissant en aval de PqsA en présence des thioesters chlorés ou fluorés. Selon les résultats présentés dans ce chapitre, il s'avère toutefois que le 4-CABA agit également sur d'autres facteurs au sein de la cellule, puisqu'un ajout de PQS ne permet pas à la bactérie d'exprimer à nouveau le régulon de MvfR. Bien que PqsA utilise plusieurs substrats, les données disponibles indiquent que son substrat naturel est l'acide anthranilique.

Grâce à cette étude (Coleman et al., 2008), la première étape de biosynthèse des HAQ, c'est-à-dire l'activation de l'acide anthranilique en anthraniloïl-CoA par l'action de PqsA a été clairement démontrée. Ce tout premier intermédiaire n'a pas été identifié dans notre laboratoire, principalement parce que seuls les composés extracellulaires ont été analysés. J'ai réalisé certaines expériences afin d'identifier l'anthraniloïl-CoA dans le milieu intracellulaire de P. aeruginosa, sans succès (données non présentées). Ceci s'explique par le fait que cet intermédiaire doit être rapidement utilisé par PqsD pour continuer la voie de synthèse des HAQ. Lors de ces tests, nous ne savions pas encore quelle enzyme utilisait le produit de PqsA. La détection d'anthraniloïl-CoA dans le milieu

intracellulaire d'un mutant $pqsD^-$ pourrait être davantage fructueuse, bien que celui-ci puisse être rapidement dégradé en absence de sa transformation par PqsD.

2.4.3.3.6.2 PqsD possède plusieurs substrats et génère de nombreux produits

Le rôle de PqsD semble plus complexe que celui de PqsA. PqsD est prédite pour être une acétyl-CoA ACP transacétylase (Bera et al., 2009; Zhang et al., 2008). Elle catalyse la réaction de condensation entre l'anthraniloïl-CoA et le malonyl-ACP ou le malonyl-CoA pour former du 3-(2-aminophenyl)-3-oxopropanoyl-CoA. Cet intermédiaire est rapidement soumis à un réarrangement intramoléculaire pour former du DHQ (Zhang et al., 2008). Toutefois, comme décrit dans ce chapitre, plusieurs autres composés proviennent de la réaction enzymatique de PqsD.

2.4.3.3.6.2.1 Le β-céto-décanoïl-CoA est-il un substrat de PqsD?

Les travaux présentés dans ce chapitre démontrent que PqsD est également requise pour la formation d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse du HHQ et du HQNO. Puisque les HAQ dérivent de l'acide anthranilique (Déziel *et al.*, 2004) et que l'anthraniloïl-CoA est un substrat connu de PqsD (Bera *et al.*, 2009), on peut supposer que cette enzyme utilise ce précurseur pour générer un intermédiaire de la biosynthèse de ces composés.

La caractérisation de la fonction enzymatique de PqsD dans la biosynthèse du DHQ (Bera et al., 2009; Zhang et al., 2008) soulève quelques questions quant à la structure des intermédiaires des HAQ. Selon la littérature, PqsD est une enzyme de condensation. Elle est requise pour condenser le malonyl-CoA ou -ACP avec l'anthraniloïl-CoA. Par extrapolation, on peut donc supposer que le rôle de PqsD est également d'induire la condensation de l'anthraniloïl-CoA avec un autre précurseur dans le cas de la biosynthèse des HAQ.

La poche enzymatique où se loge le malonyl-CoA dans PqsD est relativement petite (Bera et al., 2009), ce qui soulève des questions quant à la possibilité que cette poche puisse accueillir un β-céto-décanoïl-CoA (ou ACP), précurseur des HAQ (Bredenbruch et al., 2005). La modélisation bioinformatique du céto-décanoate-ACP au sein de PqsD n'a pas été possible en raison de l'obstruction du site hébergeant les acyl-CoA (ou ACP) par le groupement anthranilique complexé à PqsD (Bera et al., 2009). Une hypothèse est que

PqsD puisse changer de conformation afin de permettre l'entrée du précurseur, mais malgré des études poussées, aucune modification conformationnelle n'a été mise en évidence. Un autre facteur mettant en doute le rôle de substrat du β-céto-décanoïl-CoA pour PqsD est que les thioesters à longue chaîne n'ont pas un groupement carbonyle réactif exposé, requis pour générer le carbanion nucléophile responsable de l'attaque du lien thioester de la cystéine 112 de PqsD (Bera et al., 2009). Il faudrait alors une activité thioestérase, via une molécule d'eau nucléophile par exemple, pour activer le groupement carbonyle du β-céto-décanoïl-CoA. Pourtant un ajout de β-céto-décanoïl-CoA non marqué dans une culture de P. aeruginosa nourrie avec une source de carbone marqué diminue grandement le marquage de la chaîne aliphatique des HAQ, ce qui suggère qu'il est utilisé comme précurseur dans leur biosynthèse (Bredenbruch et al., 2005). L'étude de la présence ou non de la chaîne aliphatique pourra nous permettre d'en apprendre davantage sur la nature du pHHQ et sur les enzymes responsables de l'association entre le noyau quinoline et le β-céto-décanoïl-CoA dans la biosynthèse des HAQ.

2.4.3.3.6.2.2 Un intermédiaire commun entre le DHQ et les HAQ?

Étant donné que le PqsD semble préférer un plus petit substrat que le β-céto-décanoïl-CoA (Bera et al., 2009), on pourrait imaginer que l'intermédiaire-CoA résultant de la condensation de l'anthraniloïl-CoA et du malonyl-CoA (ou ACP) obtenu après l'action de PqsD et juste avant la cyclisation du DHQ (voir Figure 2-48) puisse être le pHHQ. Malheureusement cet intermédiaire est prédit pour avoir une durée de vie très courte et serait rapidement modifié pour générer spontanément du DHQ (Zhang et al., 2008). Il est donc peu probable que le malonyl-CoA soit le substrat de PqsD dans la biosynthèse des HAQ.

Figure 2-48. Schéma des intermédiaires de biosynthèse du DHQ (Bera et al., 2009).

2.4.3.3.6.2.3 Hypothèses sur l'identité du précurseur potentiel des HAQ produit par PqsD et PqsA

L'étude de la biosynthèse du DHQ démontre les propriétés de condensation de l'enzyme PqsD (Bera et al., 2009; Zhang et al., 2008) entre l'anthraniloïl-CoA et un second précurseur (inconnu pour la voie de biosynthèse des HAQ et correspondant au malonyl-CoA pour la voie du DHQ). Dans la voie de biosynthèse des HAQ, l'hypothèse la plus plausible est celle où ce second précurseur contient la chaîne aliphatique nécessaire à la biosynthèse des HAQ, probablement synthétisé par les enzymes PqsB et PqsC, comme cela a déjà été proposé (Bera et al., 2009). Dans ce cas, on s'attend à ce que cette réaction de condensation par PqsD soit la dernière étape de cette biosynthèse. Or ce n'est pas le cas puisqu'il a été démontré dans mes travaux que PqsB et PqsC agissent après PqsD, ce qui rend improbable le schéma de biosynthèse du HHQ proposé par (Bera et al., 2009) (Figure 2-49A).

Il existe un précurseur potentiel qui répond à plusieurs des caractéristiques connues du précurseur que l'on recherche et qui reste en accord avec les données publiées dans la littérature : l'anthranoïl complexé à l'enzyme PqsD. C'est un précurseur qui a déjà été isolé (Bera et al., 2009). Si l'on suppose que PqsB et PqsC interviennent dans la biosynthèse du précurseur de la chaîne aliphatique, tel que le suggère leur fonction prédite (Zhang et al., 2008), ce précurseur est donc absent chez le mutant pqsCnp. En absence de celui-ci, la voie de biosynthèse du HHQ serait bloquée, le complexe anthranoïl-PqsD s'accumulerait et les protéases intracellulaires dégraderaient peu à peu l'enzyme PqsD rendue inutile faute de substrat. Une fois l'enzyme dégradée suffisamment, le complexe en excès se retrouverait également dans l'environnement extracellulaire. L'association de l'anthranoïl avec des fragments dégradés de l'enzyme PqsD rendrait ce complexe invisible par spectrométrie de masse, puisque celui-ci aurait une masse variant en fonction de l'état de dégradation de PqsD. Lorsque le complexe est mis en présence d'un mutant pqsA np pqsH, il est pris en charge par PqsB, qui lui ajouterait le précurseur de la chaîne aliphatique (le β-céto-décanoïl-CoA) sur le groupement azoté du noyau quinoline. Finalement, PqsC viendrait cliver l'ester CoA du nouvel intermédiaire, et une cyclisation viendrait achever la formation du HHQ (Figure 2-49B).

Figure 2-49. Schémas hypothétiques de biosynthèse du HHQ à partir de l'anthranoïl-PqsD (Bera *et al.*, 2009).

(A) Hypothèse selon laquelle PqsD effectue la dernière étape enzymatique, après PqsB et PqsC (Bera et al., 2009). (B) Modèle hypothétique basé sur les résultats présentés dans ce chapitre et dans lequel PqsB et PqsC agissent après PqsD. Le complexe anthranoïl-PqsD serait le précurseur produit par PqsD et PqsA.

Néanmoins, quelques points viennent à l'encontre de cette hypothèse. Premièrement, il reste toujours le problème du faible espace de la poche enzymatique de PqsD pour accueillir le β-céto-décanoïl-CoA, ce qui fait de cette molécule un mauvais candidat comme substrat de PqsD. Deuxièmement, si le précurseur identifié est associé à des fragments dégradés de PqsD, il aurait dû se retrouver dans de nombreux échantillons lors du fractionnement HPLC, alors qu'une seule fraction le contient (Figure 2-30). Finalement, si la taille du précurseur varie selon les fragments de PqsD, une partie aurait

dû se trouver dans le rétentat lors du passage sur des pores de 3 000 Da, ce qui n'a pas été le cas (Figure 2-32).

Tenant compte de ces observations, il reste la possibilité que le précurseur soit dissocié de PqsD et associé avec un coenzyme A. Celui-ci est en effet inférieur à 3000 Da et est donc suffisamment petit pour pouvoir être excrété de la cellule, bien que ce genre de facteur ne soit généralement pas destiné à être exporté et aurait dû être détectable par LC/MS.

La présence du pHHQ dans le milieu extracellulaire est difficile à interpréter. Il est difficile d'envisager que le précurseur perde son lien thioester activé (ce qui lui permettrait de sortir de la cellule plus facilement), se retrouve à l'état de molécule inactive, pour ensuite être réactivé (dans la cellule) puis utilisé par PqsB et PqsC pour former du HHQ, car beaucoup d'énergie serait alors consommée inutilement. Sa présence dans le milieu extracellulaire d'un mutant $pqsC_{np}$ est peut-être seulement attribuable à son accumulation causée par l'absence de la protéine PqsC. Par contre, il devrait se retrouver majoritairement dans le milieu intracellulaire, ce qui n'est pourtant pas le cas non plus (Figure 2-32, p. 108).

Afin de vérifier que le précurseur extracellulaire est excrété seulement lorsqu'il s'accumule chez les mutants $pqsB_{np}$ ou $pqsC_{np}$, il serait intéressant de confirmer qu'il est absent dans le surnageant de la souche sauvage. Le surnageant de PA14 pourrait être extrait et la fraction aqueuse lavée de toute trace de HAQ serait donnée au mutant $pqsA_{np}$ pqsH. Si ce mutant ne parvient pas à générer du HHQ, cela prouve qu'en condition physiologique normale ce précurseur est seulement intracellulaire. Dans le cas contraire, il faudra toujours considérer l'hypothèse selon laquelle le précurseur recherché est une petite molécule naturellement extracellulaire et non complexée.

2.4.3.4 Les enzymes PqsB et PqsC fonctionnent-elles en complexe ?

L'étude de la production de HHQ de chacun des quatre mutants $pqsA^-$, $pqsB^-$, $pqsC^-$ et $pqsD^-$ non polaires en présence du surnageant de chaque mutant a été très révélatrice. Outre la séquence fonctionnelle de ces enzymes, elle nous apprend qu'aucun intermédiaire extracellulaire n'existe entre PqsA et PqsD et entre PqsB et PqsC, ce qui

peut suggérer que ces enzymes fonctionnent par paire, par exemple en complexe. L'étude enzymatique de PqsA et PqsD révèle que ces deux enzymes ne travaillent pas en complexe (Bera et al., 2009; Coleman et al., 2008; Lépine et al., 2007; Zhang et al., 2008). Elles peuvent toutes deux fonctionner en absence l'une de l'autre. PqsA produit de l'anthranoïl-CoA en absence de PqsD à partir d'acide anthranilique (Coleman et al., 2008). Celui-ci peut ensuite être donné à PqsD pour former du DHQ (Bera et al., 2009; Zhang et al., 2008).

La transformation du pHHQ en HHQ est catalysée par les enzymes PqsB et PqsC, comme cela a été démontré (voir section 2.3.3.1.2.4 p. 99). La vitesse de la réaction enzymatique en présence de la fraction intracellulaire contenant le pHHQ et des enzymes PqsB et PqsC (voir section 2.3.3.1.3.7 p. 110) suggère que le processus enzymatique est court. Il est donc peu probable que d'autres enzymes en plus de PqsB et PqsC soient impliquées dans la transformation du précurseur en HHQ, ce qui confirme les études présentées en début de chapitre (voir point 2.3.3.1.1.6 p. 95). Elle supporte également l'idée d'un complexe enzymatique entre PqsB et PqsC.

Les enzymes PqsB et PqsC n'ont pas encore été purifiées et caractérisées. Il est donc possible qu'elles agissent indépendamment l'une de l'autre, en générant un intermédiaire intracellulaire, ou en complexe. Ces informations pourraient être cruciales afin de mieux déterminer la voie de biosynthèse des HAQ. Il serait pertinent de vérifier l'hypothèse du complexe enzymatique en réalisant un système double hybride. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour étudier les hétéro-dimérisations entre protéines hétérologues chez les bactéries (Dmitrova et al., 1998; Dove & Hochschild, 2004). La méthode proposée par Dove et ses collaborateurs serait préférable, car l'interaction entre les deux protéines sera détectée par l'expression du gène lacZ (détectable par la couleur bleue que prennent les colonies en présence de X-gal en milieu solide) tandis que la méthode de Dmitrova détecte l'interaction protéique par une absence d'expression de lacZ, ce qui génère plus de faux-négatifs. De plus, la méthode de Dove a déjà été utilisée chez P. aeruginosa (Rietsch et al., 2005). Elle permettrait de fusionner une des protéines d'intérêt (PqsB par exemple) avec un domaine d'un activateur de transcription (λcl), et l'autre protéine (PqsC) avec un domaine d'ARN polymérase (αNTD) (Figure 2-50). S'il

y a interaction entre les deux protéines d'intérêt (PqsB et PqsC), la transcription du gène rapporteur *lacZ* sera activée.

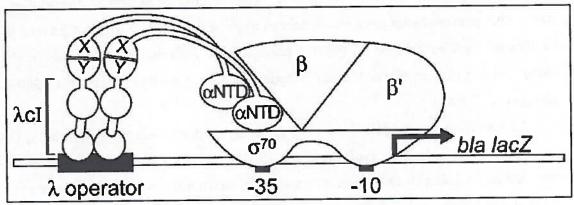


Figure 2-50. Schéma du système double-hybride proposé pour étudier l'interaction entre PqsB et PqsC (Dove & Hochschild, 2004).

En conclusion, l'étude de la voie de biosynthèse du HHQ et du HQNO présentée ici a permis de confirmer la présence de nouveaux intermédiaires, produits de PqsA et PqsD. Les étapes subséquentes liées à ce projet devraient porter sur l'identification de ces intermédiaires ainsi que sur la purification des enzymes PqsB et PqsC afin de caractériser leur(s) substrat(s).

2.4.4 Rôle des HAQ dans l'autolyse et l'iridescence chez P. aeruginosa

Le rôle des HAQ en tant que molécules antibactériennes ainsi que leur implication dans la régulation de la virulence a fait l'objet de nombreuses publications jusqu'à ce jour. Durant mon projet, je me suis intéressée particulièrement au rôle que peuvent jouer le HHQ et le HQNO dans l'apparition d'un phénotype spécifique à *P. aeruginosa* et défini par de l'iridescence et de l'autolyse observable sur gélose solide.

Ce phénotype a été décrit pour la première fois en 1899 comme une « Irisglanz Flecke » ou une brillance iridescente (Ruzicka, 1899). Depuis cette première description, les chercheurs ont tenté d'identifier la cause de ce phénomène. Le phénotype iridescent est systématiquement associé à une autolyse. Certains l'attribuent à une action phagique, tandis que d'autres refusent de croire en l'implication de bactériophages (Zierdt, 1971).

Plus tard, le composé iridescent a été isolé et identifié comme étant du HHQ (D'Argenio et al., 2007; Wensinck et al., 1967).

2.4.4.1 Les paramètres requis pour l'induction de l'autolyse et de l'iridescence varient d'une souche à l'autre dans une même espèce

Ce phénotype est observable dans certaines conditions seulement. Lors de mes travaux, il a été observé à pH neutre dans les souches qui surproduisent le HHQ en absence de HQNO, ainsi qu'à pH acide chez la souche sauvage PA14 produisant des quantités normales de HHQ et de HQNO. Ainsi, à pH neutre ou basique, la souche sauvage ne présente aucune iridescence. Ce n'est pourtant pas le cas pour les souches utilisées au début du siècle dernier, puisque l'iridescence était visible entre les pH 7 et pH 12, et disparaissait à pH 6 (Zierdt, 1971).

La souche actuelle PAO1 de *P. aeruginosa* montre également des variations dans les paramètres nécessaires à l'apparition d'iridescence. Cette souche présente une iridescence chez un mutant *pqsL* (D'Argenio *et al.*, 2002) mais pas chez le mutant *lasR* (D'Argenio *et al.*, 2007), alors que ces deux mutants sont autolytiques et iridescents chez la souche PA14 (D'Argenio *et al.*, 2007) (Figure 2-43, p. 124). Cependant, la souche PAO1 est une souche de laboratoire qui a subi des modifications l'éloignant du phénotype original de son espèce (Kohler *et al.*, 2001). Plusieurs isolats sauvages obtenus de patients ont un phénotype similaire à la souche PA14 (D'Argenio *et al.*, 2007), ce qui montre que cette dernière reste une souche représentative de son espèce. Dans la discussion qui suit je traiterai donc uniquement de la souche PA14.

2.4.4.2 Le HHQ et le HQNO affectent le phénotype d'iridescence et d'autolyse

Afin de mieux identifier les paramètres influençant l'apparition de l'iridescence, plusieurs tests ont été réalisés. Un excès de HHQ, tel que retrouvé chez les mutants autolytiques et iridescents pqsL (Tableau 2-1, p. 87) et lasR (Déziel et al., 2004), pourrait expliquer ce phénotype, mais le mutant pqsH, qui accumule le HHQ de manière tout aussi significative (données non publiées), présente nettement moins d'iridescence en milieu solide (Figure 2-43, p. 124). Il semblerait qu'il faille combiner un excès de HHQ

avec une absence de HQNO pour recréer autolyse et iridescence; cependant, le mécanisme reste encore inconnu.

L'absence de HQNO pourrait également être responsable de l'autolyse et l'iridescence observées chez les mutants $pqsL^-$ et $lasR^-$. Toutefois, d'autres mutants ne produisant pas de HQNO, tels que les mutants $pqsA^-$, $pqsB^-$, $pqsC^-$ ou $pqsD^-$ ne présentent ni autolyse ni iridescence.

L'hypothèse la plus plausible est que l'excès de HHQ soit toxique pour la bactérie, mais que le HQNO parvienne à contrer la toxicité de cet excès. Celle-ci se base sur le fait qu'un mutant pqsH qui surproduit le HHQ en présence de HQNO ne présente pas d'autolyse ou d'iridescence, et que les mutants qui ne produisent pas de HQNO n'en présentent pas non plus s'ils ne produisent pas de HHQ (par exemple pqsA, Figure 2-43). Ce serait alors la balance entre la production de HHQ et de HQNO qui déterminerait l'apparition ou non du phénotype observé. Afin de valider cette hypothèse, on pourrait quantifier la production de HHQ et de HQNO chez les mutants vfr et fimL qui présentent également un phénotype d'autolyse et d'iridescence (Whitchurch et al., 2005). Puisque Vfr contrôle positivement lasR (Albus et al., 1997), il est fort probable que la production de HHQ soit augmentée lorsque celui-ci est muté.

2.4.4.2.1 L'autolyse, associée à l'iridescence, témoigne d'un état de stress chez P. aeruginosa

Il s'avère qu'à pH neutre, l'iridescence est induite en présence d'un excès de HHQ couplé à une absence de HQNO. Dans une souche pqsA'pqsH qui n'exprime aucun HAQ, un ajout de HHQ mène à l'apparition de l'iridescence (D'Argenio et al., 2007). Celle-ci est éliminée si le HQNO est également rajouté (Luke Hoffman, communication personnelle). Étant donné qu'elle s'accompagne d'une autolyse, l'iridescence témoigne d'un état de stress de la bactérie. De ce fait, on peut supposer que le HHQ génère une source de stress que le HQNO inhibe.

Des études antérieures ont proposé que l'iridescence et l'autolyse soient dues à un excès de PQS (D'Argenio et al., 2002). Toutefois, la nature du composé iridescent (D'Argenio et al., 2007; Wensinck et al., 1967), ainsi que la présence d'iridescence dans

le double mutant $pqsH^-pqsL^-$ qui produit seulement du HHQ (résultats obtenus dans notre laboratoire), infirment cette hypothèse.

Aucune étude à ce jour ne rapporte un effet toxique du HHQ. Toutefois, si celui-ci est contré en présence de HQNO, et puisque hormis chez les mutants lasR et pqsL ces deux molécules sont co-synthétisées, il n'est pas surprenant que l'effet ait pu passer inaperçu. Il serait intéressant d'ajouter du HHQ dans un mutant pqsA afin de vérifier que la présence de ce composé en absence de HQNO génère réellement de l'iridescence. Un excès de HHQ pourrait également être donné à d'autres espèces bactériennes afin de vérifier si une activité antimicrobienne, de l'iridescence ou de l'autolyse peuvent être observées.

2.4.4.2.2 Le HQNO inhibe l'apparition d'iridescence en bloquant la respiration cellulaire

Quant au rôle possible de protection par le HQNO, il est connu que ce dernier permet la variation de phase chez Staphylococcus aureus (voir le mécanisme à la section 2.1.5.1.3, p. 57), qui permet à cette bactérie de survivre en présence d'aminoglycosides, une famille d'antibiotiques nécessitant la respiration cellulaire pour entrer dans la cellule (Hoffman et al., 2006). Cette protection contre les aminoglycosides est plus aisée à expliquer, car il est connu que le HQNO bloque l'oxydation du cytochrome b et la réduction du cytochrome c (Voggu et al., 2006). Chez S. aureus, il inhibe l'oxydation du cytochrome b₁ et la réduction du cytochrome a₂ (Machan et al., 1991; Machan et al., 1992). Puisque ces cytochromes sont impliqués dans la respiration cellulaire aérobie, leur inhibition oblige la bactérie à modifier son métabolisme. Ainsi, lorsque S. aureus est exposé au HQNO, elle favorise la fermentation au détriment de la respiration (Hoffman et al., 2006). Elle n'est alors plus capable de synthétiser plusieurs composants nécessaires à la voie respiratoire. Les aminoglycosides ne peuvent alors plus entrer dans la cellule. Si l'on envisage que le rôle protecteur du HQNO serait d'induire un changement de métabolisme au niveau de la cellule afin de limiter la respiration cellulaire, il diminuerait tout stress causé par la respiration.

L'iridescence et l'autolyse sont-elles liées à la respiration cellulaire ? Parmi les mutants non-iridescents et non-autolytiques trouvés lors des deux criblages, plusieurs

sont affectés dans la voie de la respiration cellulaire (voir section 2.3.3.1.1.5, p. 93). Les gènes *nuoD* et *nuoF* codent respectivement les chaînes D et F de la NADH déshydrogénase, faisant elle-même partie de la NADH coenzyme Q oxydoréductase (complexe I de la chaîne respiratoire), tandis que PA14_57560 (PA4430 chez PAO1) code un probable cytochrome b. Ces enzymes sont essentielles pour la respiration cellulaire en présence de certains accepteurs d'électrons (Hasegawa *et al.*, 2003; Platt *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2003; Zannoni, 1989). Quant au gène *sucD*, il intervient dans la production de NADH également nécessaire à la respiration cellulaire, *via* le cycle TCA (Platt *et al.*, 2008). Ainsi, en présence de HQNO qui inhibe la respiration, ou en présence d'une mutation ayant le même effet, on constate une disparition de l'iridescence et de l'autolyse chez *P. aeruginosa*. Ceci supporte l'hypothèse selon laquelle ce phénotype est relié à la respiration cellulaire bactérienne.

2.4.4.2.3 Un excès de HHQ induirait un stress au sein de la bactérie, probablement via la voie respiratoire

Si le rôle protecteur du HQNO est de diminuer la respiration cellulaire pour inhiber l'apparition d'iridescence, c'est que le rôle toxique du HHQ doit emprunter également cette voie. Les quinolones sont connues pour inhiber l'ADN gyrase et bloquer ainsi la réplication de l'ADN ainsi que la topoisomérase IV (Hooper, 1999), mais aucune étude ne confirme ce rôle pour le HHQ. Des chercheurs se sont intéressés à l'effet post-antibiotique des quinolones, c'est-à-dire la présence d'inhibition persistante de plusieurs processus métaboliques indispensables à la croissance bactérienne. Il s'avère que plusieurs quinolones affectent la respiration bactérienne (Majtan & Majtanova, 1998) et inhibent l'activité mitochondriale (Lawrence et al., 1993; Tominaga et al., 2002). Néanmoins, bien que le HHQ soit une quinolone, son action sur la respiration n'a jamais été spécifiquement étudiée.

En milieu acide, une plus faible quantité de HHQ suffit pour générer le stress induisant l'iridescence et l'autolyse, comme on peut l'observer chez la souche sauvage PA14. Dans ces conditions, le HQNO ne serait plus suffisant pour protéger la cellule contre le stress. Un milieu acide génère-t-il davantage de stress oxydatif? La respiration

est-elle stimulée dans ces conditions ? Ces questions n'ont pas été étudiées chez *P. aeruginosa*, bien qu'il soit connu que le pH optimal pour l'activité de certains cytochromes soit de 6 (Yamanaka, 1976).

2.4.4.2.4 Nature du stress généré par la respiration cellulaire

La respiration cellulaire peut générer plusieurs stress. En conditions aérobie, ce sont les espèces réactives à l'oxygène qui sont générées, tandis qu'en condition anaérobie ce sont davantage les métabolites de la dénitrification, principalement le NO, qui sont toxiques. En condition aérobie ou anaérobie la respiration génère donc un stress oxydatif ou nitrosatif, respectivement. Si le HHQ génère un stress via la voie respiratoire, ce stress est-il oxydatif ou nitrosatif? Le rôle du NO dans l'apparition de l'iridescence a été étudié. Un mutant norB, qui accumule le NO, ne présente pas d'iridescence, ce qui suggère que le NO n'est pas responsable de ce phénotype. Toutefois, la présence de HQNO pourrait contrecarrer l'effet toxique de cette molécule. Un meilleur test serait de vérifier qu'en absence de NO, c'est-à-dire dans un mutant nirQ, l'iridescence typiquement visible à pH 6, 5 soit absente.

Quant au lien entre l'iridescence et le stress oxydatif, il n'est pas évident non plus. Les mutants $lasR^-$ et $pqsL^-$ exposés à du peroxyde d'hydrogène ne présentent pas d'iridescence à proximité du disque imbibé (Figure 2-46), ce qui suggère que le stress oxydatif n'induit pas l'iridescence, au contraire. Un résultat similaire est observé lors d'un ajout de nitrites (communication personnelle du Dr. Hoffman). Il est intéressant de mentionner que ces molécules sont également connues pour réprimer les gènes nuo (Palma et al., 2004; Platt et al., 2008). Il est donc clair que ces gènes interviennent significativement dans le phénotype que l'on étudie.

2.4.5 Conclusion du projet

En conclusion, l'étude de la voie de biosynthèse des HAQ présentée dans ce chapitre a permis plusieurs nouvelles découvertes. D'une part, j'ai démontré que le phénotype d'iridescence et d'autolyse est influencé par la production de HHQ et de HQNO. Le premier générerait possiblement un stress de manière indirecte, que le HQNO parvient à contrecarrer en bloquant la chaîne de transport d'électrons de la respiration

cellulaire. La voie de biosynthèse de ces deux molécules a été étudiée, et un précurseur produit par les enzymes PqsA et PqsD a été isolé pour les deux composés. Mes résultats suggèrent qu'il existe un précurseur commun au HHQ et au HQNO, et que celui-ci serait transformé en précurseur-NO par l'enzyme PqsL avant d'être modifié en HQNO par les enzymes PqsB et PqsC. Il n'est toutefois pas exclu que le précurseur du HQNO soit indépendant de celui du HHQ. L'identification structurelle de ces différents intermédiaires aidera à déterminer le chevauchement entre la voie de biosynthèse du HHQ et du HQNO. De plus, l'étude des enzymes PqsB et PqsC pourrait également apporter des éclaircissements quant à leur rôle enzymatique dans la voie de biosynthèse des HAQ. La voie complète de la biosynthèse des HAQ permettra de faciliter les recherches pour bloquer la production de ces molécules et ainsi affaiblir le potentiel pathogène de *P. aeruginosa*.

3 Étude de la fonction de PqsE

3.1 Introduction : état des connaissances sur PqsE

À ce stade de lecture de ce document, les différents systèmes de QS chez P. aeruginosa ont été décrits et étudiés. Les systèmes Las et Rhl, sujets principaux du chapitre 1, sont les mieux compris. Le système MvfR-PQS, abordé au chapitre 2, a été découvert et étudié entre autres par le Dr Éric Déziel et fait l'objet de recherches majeures effectuées dans plusieurs laboratoires. Outre la biosynthèse et le rôle des molécules-signal dont dépend ce nouveau système, un volet important de l'étude de celuici se concentre sur le mécanisme d'activation de son régulon. En effet, si LasR et RhlR sont des régulateurs directs d'un grand nombre de gènes, ce n'est pas le cas de MvfR. Jusqu'à maintenant, tout indique que les seuls gènes directement régulés par MvfR sont les gènes de l'opéron pqsABCDE (Xiao et al., 2006a), ainsi que probablement les gènes de l'opéron phnAB (Cao et al., 2001), bien que l'interaction directe entre la région promotrice de ce dernier et MvfR n'ait pas été démontrée. Ces deux opérons sont impliqués dans la biosynthèse des molécules-signal du système (Wade et al., 2005; Xiao et al., 2006b), bien que près de 150 autres soient affectés, vraisemblablement de manière indirecte, en absence de celui-ci (Déziel et al., 2005).

Les premières hypothèses quant à l'activation du régulon du système MvfR-PQS suggéraient que le PQS soit la molécule transductrice (Diggle et al., 2003; Gallagher et al., 2002; McKnight et al., 2000). Toutefois, Déziel et al. (Déziel et al., 2004) ont mis en évidence que la diminution de virulence observée chez un mutant $mvfR^-$ n'est pas due à l'absence de PQS mais bien à l'inactivation du gène pqsE. Ces affirmations se basent sur le fait que le phénotype d'un mutant $pqsE^-$ est semblable à celui d'un mutant $mvfR^-$, à l'exception près des HAQ, présents chez $pqsE^-$ mais absents chez $mvfR^-$ (Déziel et al., 2004).

Sur les 7 gènes activés directement par MvfR, les quatre premiers, pqsABCD, sont nécessaires à la biosynthèse des HAQ (Déziel et al., 2004). Quant à pqsE, sa fonction demeure encore inconnue. Une mutation dans celui-ci n'affecte pas la production des différents HAQ (Déziel et al., 2004), mais diminue drastiquement la virulence de la souche mutée, comme l'a montré un test de mortalité chez les souris (Déziel et al., 2005) et chez les mouches (Hazan et al., 2010). Une analyse transcriptomique a révélé que plus de 300 gènes sont affectés dans un mutant n'exprimant pas pqsE, dont de nombreux gènes de virulence et de résistance à différents stress, connus pour être régulés par le QS (Hazan et al., 2010). Les gènes affectés dans un mutant pqsE sont essentiellement les mêmes que ceux affectés dans un mutant mvfR, à l'exception près des gènes phnAB et pqsABCDE, transcrits chez pqsE mais inactifs dans un mutant mvfR (Déziel et al., 2005; Hazan et al., 2010). PqsE semble donc avoir un rôle essentiel dans l'expression de nombreux gènes liés au QS et à la virulence chez P. aeruginosa.

Dans les sections suivantes, je décris les trois observations majeures liées à l'effet de PqsE sur le phénotype et la virulence de *P. aeruginosa*: son effet drastique sur la production de pyocyanine, l'induction d'un stress oxydatif en sa présence et son rôle sur la régulation de nombreux gènes liés au QS.

3.1.1 PqsE induit la production de pyocyanine

Le phénotype le plus visible d'un mutant pqsE par rapport à la souche sauvage est l'absence totale de production d'un pigment bleu appelé pyocyanine (Gallagher *et al.*, 2002). Ses effets sur la cellule ainsi que les facteurs qui régulent son expression sont décrits ci-après.

3.1.1.1 Biosynthèse de la pyocyanine

La pyocyanine est un composé de la famille des phénazines. Ces molécules ont été l'objet de nombreuses études tant dans le domaine clinique que pharmaceutique ces 50 dernières années (Laursen & Nielsen, 2004). Les phénazines sont des composés hétérocycliques, produits principalement par *Pseudomonas* spp. et *Streptomyces* spp. Leur fonction première n'est pas précisément connue, bien qu'elles soient impliquées dans la virulence et dans la survie chez *Pseudomonas* (Price-Whelan *et al.*, 2006).

La pyocyanine est la phénazine la plus étudiée chez *P. aeruginosa*. Sous sa forme oxydée, elle se caractérise par une pigmentation bleue, donnant la couleur caractéristique des cultures de cette bactérie (Hassett *et al.*, 1992). L'intérêt pour cette molécule s'explique par son implication dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. En effet, un mutant incapable de la produire présente nettement moins de virulence que la souche sauvage (Lau *et al.*, 2004).

L'absence de production de pyocyanine dans un mutant pqsE est en corrélation avec la très forte diminution de transcription des gènes des opérons phzA1-G1 et phzA2-G2 présents dans les données transcriptomiques (Hazan et al., 2010). Ceux-ci sont nécessaires pour transformer l'acide chorismique en acide phénazine-1-carboxylique ou PCA (Figure 3-1). Par la suite, le PCA génère trois phénazines différentes, soit la phénazine-1-carboxamide, la pyocyanine et l'hydroxyphénazine, selon l'enzyme impliquée (PhzH, PhzM et PhzS, ou PhzS, respectivement). Ces enzymes sont toutes au moins deux fois moins exprimées dans un mutant pqsE par rapport à la souche sauvage (Hazan et al., 2010).

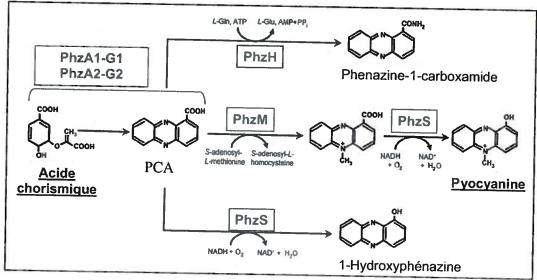


Figure 3-1. Biosynthèse des phénazines chez *P. aeruginosa*. Adapté de Mavrodi *et al.* (2001). PCA = acide phénazine-1-carboxylique.

3.1.1.2 Régulation de la production de pyocyanine

La régulation des deux opérons de biosynthèse des phénazines chez P. aeruginosa est fort complexe. Bien qu'ils se ressemblent, ces deux groupes de gènes possèdent une

région promotrice très différente, ce qui suggère une régulation spécifique pour chacun d'eux (Ledgham et al., 2003b; Soberon-Chavez et al., 2005). Il a été démontré que RhlR régule ces deux opérons ainsi que les gènes phzS et phzM (Mavrodi et al., 1998; Mavrodi et al., 2001). Bien que de très nombreux régulateurs modulent la quantité de pyocyanine produite, jusqu'à présent seuls les gènes phz, pqsE et rhlR semblent essentiels et indispensables pour sa production (Gallagher et al., 2002). Le Tableau 3-1 regroupe tous les régulateurs connus pour influencer positivement ou négativement la production de pyocyanine, dont un très grand nombre sont également liés au QS.

Tableau 3-1. Liste des régulateurs influençant la production de pyocyanine chez P. aeruginosa.

Nom du	Gène	Gène dans	Régulation de	Référence
régulateur	dans	PA14	la pyocyanine	
	PAO1			
Vfr	PA0652	PA14_08370	activateur	(Beatson et al., 2002a)
QscR	PA1898	PA14_39980	répresseur	(Chugani et al., 2001;
				Ledgham et al., 2003b)
RsmA	PA0905	PA14_52570	répresseur	(Pessi et al., 2001)
MvaT	PA4315	PA14_56070	répresseur	(Diggle <i>et al.</i> , 2002)
VqsR	PA2591	PA14_30580	activateur	(Juhas et al., 2004)
RpoN	PA4462	PA14_57940	activateur	(Hendrickson et al., 2001)
GacA	PA2586	PA14_30650	activateur	(Reimmann et al., 1997)
RpoS	PA3622	PA14_17480	répresseur	(Suh et al., 1999)
PtxR	PA2258	PA14_35380	répresseur	(Carty et al., 2006)
QteE	PA2593	PA14_30560	répresseur	(Siehnel et al., 2010)
Hfq	PA4944	PA14_65310	répresseur	(Sonnleitner et al., 2006)
AmpR	PA4109	PA14_10800	répresseur	(Kong et al., 2005)
PA2384	PA2384	PA14_33830	répresseur	(Zheng et al., 2007)
RsaL	PA1431	PA14_45950	répresseur	(Rampioni et al., 2007)
PmpR	PA0964	PA14 51810	répresseur	(Liang et al., 2008)
MexT	PA2492	PA14_32410	répresseur	(Tian et al., 2009)
LasR	PA1430	PA14_45960	activateur	(Diggle et al., 2003)
RhIR	PA3477	PA14_19120	activateur	(Ochsner et al., 1994)
MvfR	PA1003	PA14_51430	activateur	(Cao et al., 2001)
OxyR	PA5344	PA14_70560	répresseur	(Vinckx et al., 2010)

La pyocyanine est donc un facteur de virulence contrôlé en bonne partie par le QS chez *P. aeruginosa*. L'effet de PqsE sur ce pigment est étudié séparément des autres facteurs contrôlés par le QS pour deux raisons. La première est que celle-ci pourrait être

une molécule-signal elle-même, et avoir des effets sur d'autres facteurs (Dietrich et al., 2006). Puisque ce nouveau rôle n'est pas encore caractérisé en profondeur, il mérite d'être traité à part dans ce projet. Ensuite, l'effet de PqsE sur la production de pyocyanine est drastique, puisqu'aucune trace de pyocyanine n'est visible chez le mutant pqsE, alors que les autres facteurs contrôlés par le QS sont affectés moins drastiquement et présentent une diminution et non une abolition de production dans ce même mutant.

3.1.2 PqsE active le stress oxydatif chez P. aeruginosa

A côté de l'effet drastique de PqsE sur la production de la pyocyanine, une analyse transcriptomique du mutant pqsE montre que parmi les gènes les plus affectés se retrouvent de nombreux gènes activés par le stress oxydatif (Hazan et al., 2010).

De nombreuses études se sont intéressées aux gènes que possèdent *P. aeruginosa* pour se défendre contre le stress oxydatif. Palma *et al.* (Palma *et al.*, 2004) ainsi que Salunkhe *et al.* (Salunkhe *et al.*, 2005) ont réalisé des études transcriptomiques afin d'identifier les gènes surexprimés par la bactérie en présence d'un agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène. Une autre étude a été effectuée sur une culture de la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa* dans laquelle de la pyocyanine avait été rajoutée (Dietrich *et al.*, 2006). Enfin, une dernière étude transcriptomique s'est portée sur le mutant *soxR* (Palma *et al.*, 2005). SoxR est un régulateur transcriptionnel contrôlant la réponse au stress oxydatif. Une mutation de celui-ci a permis d'identifier les gènes qu'il contrôle. Les principaux gènes identifiés lors de ces études sont présentés dans le Tableau 3-2 et ont été comparés avec les gènes les plus fortement affectés dans un mutant *pqsE*. Sur les 11 gènes les plus affectés dans ce dernier, 8 se retrouvent également dans au moins l'une des données transcriptomiques liées au stress oxydatif chez *P. aeruginosa* (Tableau 3-2).

Quant aux trois autres gènes, *ahpB* est aussi impliqué dans la réponse cellulaire au stress oxydatif et est activé par OxyR (Ochsner *et al.*, 2000), *phzB* est impliqué dans la biosynthèse de pyocyanine, source de stress oxydatif (Mavrodi *et al.*, 2001) (voir section 3.1.2.1.3, p. 166), et *cyoE* est une protéine du cytochrome o impliquée dans la respiration cellulaire et nécessaire pour la survie bactérienne en présence de H₂O₂, du moins chez *E. coli* (Lindqvist *et al.*, 2000). Ainsi, sur les 11 gènes dont la transcription est la plus

affectée par PqsE, un seul est impliqué dans la production d'une molécule oxydante, et les 10 autres sont impliqués dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif.

Tableau 3-2. Identification des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif dans différentes études et comparaison avec les gènes affectés dans un mutant pqsE.

Gènes activés par ajout de H ₂ O ₂ (Palma et al., 2004; Salunkhe et al., 2005)	Gènes activés par ajout de pyocyanine (Dietrich et al., 2006)	Gènes activés par SoxR ((Palma et al., 2005))	Gènes activés par PqsE (Transcriptome pqsE (Hazan et al., 2010)
PA3237	ND	ND	PA3237
ND	mexGHI-opmD	mexGHI-opmD	mexGHI-opmD
ND	PA2274	PA2274	PA2274
katB	ND	ND	katB
ND	PA3718	PA3718	PA3718

ND. Non Déterminé.

Puisque le stress oxydatif est l'un des domaines affectés par PqsE, il est nécessaire d'en comprendre la teneur, d'identifier ses sources et ses effets sur la cellule et de décrire la manière dont les mécanismes de défense sont régulés.

3.1.2.1 Molécules induisant un stress oxydatif

Le stress oxydatif est un terme général utilisé pour décrire le niveau de dommage oxydatif causé par des radicaux oxygénés libres (ROS)). Ces ROS sont des dérivés du métabolisme de l'oxygène (Figure 3-2). Ils se retrouvent dans tous les organismes aérobies.

Le niveau de stress oxydatif est déterminé par la balance entre le taux de production de dommage oxydatif et le taux de détoxification / dégradation / réparation cellulaire face à ces dommages. C'est donc une balance entre la production de ROS et leur inactivation par des défenses cellulaires. Ces défenses sont des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutases SOD, catalases et peroxydases), des enzymes de séquestration du fer, des

agents de séquestration des radicaux libres et des enzymes de réparation de l'ADN (Beyer et al., 1991; Imlay & Linn, 1987; Imlay & Linn, 1988; Ma et al., 1999; Martinez & Kolter, 1997; Zhang et al., 1996). P. aeruginosa possède un arsenal impressionnant de défenses contre le stress oxydatif. Celui-ci comprend deux superoxydes dismutases (FeSOD SodB et Mn-SOD SodA), qui détoxifient le superoxyde en peroxyde d'hydrogène, (Brown et al., 1995; Ma et al., 1999), trois catalases (KatA, KatB, KatC) qui protègent la cellule contre l'effet toxique du peroxyde (Hassett et al., 1993; Hassett et al., 1995) et quatre hydroperoxydes réductases (AhpA, AhpB, AhpCF, and Ohr) qui détoxifient le peroxyde (Ochsner et al., 2000; Ochsner et al., 2001).

Figure 3-2. Métabolisme de l'oxygène et production de ROS (espèces réactives d'oxygène). Adapté de Chabot *et al.* (1998).

Il existe plusieurs molécules induisant ce type de stress dans la cellule. Celles-ci sont décrites dans les sous-sections suivantes.

3.1.2.1.1 Anion superoxyde

La production d'anion superoxyde (O₂⁻) est estimée à 5 μM/s chez *E. coli* (Seaver & Imlay, 2004). Celui-ci endommage de nombreuses cibles au sein de la cellule. Il inactive entre autres les centres Fer-Soufre [4Fe-4S]³⁺ des enzymes en les oxydant et en libérant un atome de fer (Flint *et al.*, 1993). Ce dernier s'associe aisément aux lipides et aux protéines, ce qui étend les effets néfastes de l'anion superoxyde dans la cellule entière (Keyer & Imlay, 1996).

3.1.2.1.2 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un composé non chargé qui pénètre les membranes. Ainsi, la présence exogène d'H₂O₂ augmente le stress oxydatif au sein des cellules. Environ 15 μM/s sont produits par les cellules aérobies (Seaver & Imlay, 2004). Ce composé inactive aussi les enzymes contenant un centre fer-soufre en libérant un atome de fer (Jang & Imlay, 2007). Il oxyde le fer ferreux intracellulaire, associé entre autres à l'ADN, ce qui génère des mutations (Henle *et al.*, 1999).

3.1.2.1.3 Mécanismes et composés générant l'anion superoxyde et/ou le peroxyde d'hydrogène

Plusieurs sources des ROS ont été identifiées. La chaîne respiratoire est la source majeure de production de l'anion superoxyde (Korshunov & Imlay, 2006). Ce n'est toutefois pas le cas pour le peroxyde d'hydrogène, puisque celui-ci n'est pas substantiellement diminué lors de la mutation des enzymes respiratoires (Seaver & Imlay, 2004).

Le peroxyde d'hydrogène est aussi formé à partir de procédés chimiques lorsque des métaux et du soufre réduits remontent à la surface de sédiments anaérobies et sont exposés à l'oxygène (Imlay, 2008).

Enfin, certaines plantes et micro-organismes sécrètent des composés qui génèrent du superoxyde à partir de l'oxydation d'enzymes. Ces composés sont les viologènes (tels que le paraquat), les phénazines et les quinolones. La pyocyanine est reconnue pour être un facteur induisant un stress oxydatif pour les cellules autant procaryotes qu'eucaryotes (Baron & Rowe, 1981; Gardner, 1996; Hassan & Fridovich, 1980; Lau et al., 2004; Usher et al., 2002). On la retrouve chez P. aeruginosa sous forme oxydée (bleue) ou réduite (incolore à pH neutre). La pyocyanine réduite est un radical libre instable qui réagit rapidement avec l'oxygène. Cette auto-oxydation mène à la formation d' O₂-, du H₂O₂ ou, en présence de métaux tels que le fer, du radical hydroxyle OH (Hassett et al., 1992). Le mécanisme proposé pour l'action de la pyocyanine veut que celle-ci déséquilibre le flux d'électrons, induisant ainsi la production d'agents oxydants, menant éventuellement à la mort cellulaire (Hassan & Fridovich, 1980).

3.1.2.2 Régulateurs contrôlant le stress oxydatif

3.1.2.2.1 Le régulateur SoxR est activé en présence de superoxyde

L'anion superoxyde ainsi que les composés qui le génèrent sont des inducteurs du régulon SoxR. SoxR est une enzyme contenant un centre [2Fe-2S] à l'état réduit. En présence de superoxyde, ce centre est oxydé, ce qui active alors SoxR (Kobayashi & Tagawa, 2004). Chez *E. coli*, SoxR vient activer un régulateur transcriptionnel, SoxS, qui lui-même active de nombreux gènes de protection contre le stress oxydatif (Greenberg *et al.*, 1990). Chez *P. aeruginosa*, aucun homologue à SoxS n'a été répertorié, bien que SoxR soit présent. Le gène à côté de SoxR, PA2274, est directement activé par SoxR, bien que sa séquence ne prédise aucun rôle de régulateur (Kobayashi & Tagawa, 2004). Plusieurs autres gènes sont activés directement par SoxR (Palma *et al.*, 2005). On retrouve la pompe à efflux MexGHI-OpmD, ainsi que le gène PA3718, de fonction inconnue. La totalité du régulon de SoxR se retrouve dans les gènes les plus affectés chez le mutant *pqsE* (Hazan *et al.*, 2010).

Une étude suggère que SoxR n'est pas un acteur essentiel pour la protection contre le stress oxydatif, puisqu'un mutant $soxR^-$ n'est pas plus sensible à ce type de stress (Palma et al., 2005). Il est néanmoins lié au superoxyde puisque c'est ce dernier qui permet de l'activer et donc d'induire la transcription de son régulon. Enfin, il faut souligner le fait que la pyocyanine est également un composé capable d'activer SoxR (Dietrich et al., 2006). En effet une étude transcriptomique a évalué l'impact d'un ajout de pyocyanine sur la régulation des gènes de P. aeruginosa. La transcription des gènes dépendant de SoxR a été augmentée en présence de pyocyanine, mais seulement lors que ce régulateur est fonctionnel au sein de la bactérie.

3.1.2.2.2 Le régulateur OxyR est activé en présence de stress oxydatif

Les catalases et les hydroperoxyde-réductases sont des enzymes de défense contre le stress oxydatif dont l'expression dépend du régulateur transcriptionnel de type LysR, OxyR. Un mutant oxyR est hypersensible à toutes les sources de stress oxydatif. OxyR doit être oxydé pour pouvoir activer son régulon, à l'instar de SoxR (Storz et al., 1990), mais à la différence de ce dernier qui ne répond qu'au superoxyde, OxyR réagit également au peroxyde d'hydrogène et aux hydroperoxydes organiques (Ochsner et al.,

2000). Chez *P. aeruginosa*, le contrôle direct de la transcription des gènes *katB-ankB*, *ahpB* et *ahpC-F* par OxyR a été démontré (Ochsner *et al.*, 2000). Les gènes *katB*, *ahpB* et *ankB* sont 15, 12 et 5 fois moins exprimés chez le mutant *pqsE* par rapport à la souche sauvage, respectivement (Hazan *et al.*, 2010).

Chez E. coli, OxyR active également un petit ARN oxyS, qui agit lui-même comme un régulateur positif ou négatif en réponse au stress oxydatif (Zhang et al., 1997). Aucun équivalent n'a encore été découvert chez P. aeruginosa (Ochsner et al., 2000).

3.1.3 PqsE active un grand nombre de gènes contrôlés par le quorum sensing

Outre son effet sur la pyocyanine et sur le stress oxydatif, le troisième domaine que PqsE semble affecter chez *P. aeruginosa* est l'expression de gènes connus pour être sous le contrôle du QS.

3.1.3.1 Identification des facteurs de virulence affectés par PqsE et contrôlés par le quorum sensing

L'un des attraits de l'étude de PqsE est qu'en son absence, la virulence de P. aeruginosa est fortement compromise dans un modèle de mouches (Hazan et al., 2010), de levures (Hazan et al., 2010) ou de brûlures infectées chez la souris (Déziel et al., 2005). Celui-ci contrôle donc des facteurs de virulence essentiels à la pathogénicité de cette bactérie. Les quelques études qui ont porté sur le mutant pqsE rapportent une diminution de plusieurs gènes ou de facteurs impliqués dans la virulence, tels que la pyocyanine, la production d'élastase et celle de rhamnolipides (Farrow et al., 2008). Ces deux derniers ne sont toutefois pas diminués aussi drastiquement que la pyocyanine.

Selon les données transcriptomiques du mutant pqsE, près de 75 gènes contrôlés par PqsE codent des facteurs de virulence putatifs ou confirmés (Hentzer et al., 2003; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003), dont des protéases, des hémolysines, des lectines, du cyanure d'hydrogène, la pyochéline, des pyocines, la pyocyanine et les rhamnolipides (Hazan et al., 2010). Près de 46% des gènes contrôlés par LasR / RhlR (Schuster et al., 2003) le sont également par PqsE.

Puisque PqsE affecte tous ces gènes, il est important de connaître les facteurs de régulation du QS qui influencent leur expression.

3.1.3.2 Facteurs de régulation intervenant dans le quorum sensing de P. aeruginosa

De nombreux facteurs de régulation interviennent dans le QS de *P. aeruginosa*. La Figure 3-3 présente un schéma des interactions connues entre ces différents facteurs. On y retrouve principalement les régulateurs affectant ou affectés par les systèmes de QS Las, Rhl et MvfR. Les différents régulateurs et molécules-signal qui y sont représentés sont décrits plus en détail dans les sous-sections suivantes.

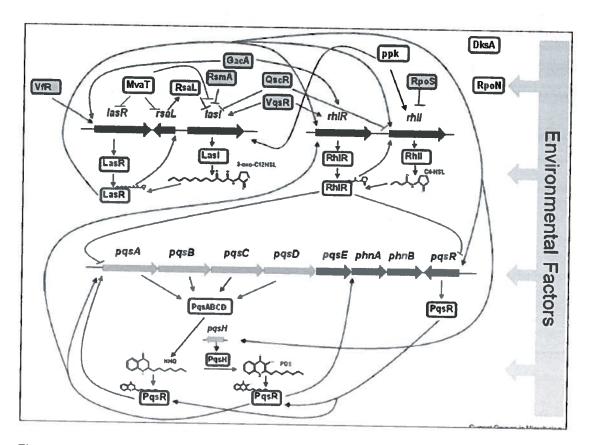


Figure 3-3. Représentation de la plupart des facteurs influençant le *quorum sensing* chez *P. aeruginosa.*

Adapté de Williams & Camara (2009). PqsR est un synonyme de MvfR.

3.1.3.2.1 Régulateurs transcriptionnels affectant le quorum sensing

RpoS (aussi connu comme σ^s ou σ^{38}) est un facteur de transcription central impliqué dans la réponse à différents stress induisant une réduction ou un arrêt de croissance (Hengge-Aronis, 2002). On lui reconnaît une action sur la régulation de l'alginate, de la pyocyanine et de l'exotoxine A. Il est également impliqué dans la résistance aux stress induits par la chaleur, l'acidité, la forte osmolarité, le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol. Selon une analyse transcriptomique, près de 800 gènes sont régulés par RpoS, dont une bonne partie inclut des gènes connus pour être contrôlés par les AHL et le QS (Schuster et al., 2004a).

RpoN (ou σ^{54}) régule également de nombreuses fonctions métaboliques ainsi que plusieurs facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Hendrickson *et al.*, 2001). Une mutation dans le gène *rpoN* induit une variation de production des AHL, qui peut être soit augmentée (Heurlier *et al.*, 2003), soit diminuée (Thompson *et al.*, 2003) en fonction des paramètres de croissance utilisés. RpoN est donc un lien entre la régulation par le QS et les conditions environnementales auxquelles sont exposées les bactéries (Heurlier *et al.*, 2003).

RsaL, MvaT et QscR sont trois régulateurs exerçant une répression transcriptionnelle sur les gènes liés au QS. Le premier, RsaL, est une protéine agissant directement sur *lasI* pour diminuer sa transcription. Il serait en compétition directe avec le complexe LasR/3-oxo-C₁₂-HSL pour le site de fixation sur le promoteur de *lasI* (de Kievit *et al.*, 1999). Il régule directement plusieurs autres gènes tels que les gènes *phzABCDEFG* et les gènes *hcnABC* (synthèse de cyanure d'hydrogène) (Rampioni *et al.*, 2007). Il affecte près de 130 gènes dont plusieurs impliqués dans la virulence, et ce indépendamment de son effet sur *lasI* (Rampioni *et al.*, 2007; Rampioni *et al.*, 2009).

Le second répresseur, MvaT, intervient dans la répression du QS à faible densité cellulaire. Il est connu pour affecter la production d'AHL, de lectine, de pyocyanine et d'élastases (Diggle et al., 2002). Il agirait également sur lasR, rsaL, rpoS et rsmZ (Castang et al., 2008).

QscR, tout comme VqsR, sont des régulateurs de type LuxR, comme LasR et RhlR. Ils se distinguent toutefois de ces deux derniers puisqu'aucun gène de synthase d'AHL ne se trouve à proximité du gène qui les code. Dans un mutant qscR, l'expression de lasl et

de *rhlI* est avancée et près de 400 gènes sont différemment exprimés, tant positivement que négativement (Lequette *et al.*, 2006). QscR formerait des hétérodimères avec LasR et RhlR pour empêcher leur activation (Ledgham *et al.*, 2003b).

En absence de VqsR, aucune production d'AHL n'est observée, corrélée à une virulence très fortement compromise (Juhas *et al.*, 2004). Ce gène est toutefois régulé luimême par le système LasR/3-oxo-C₁₂-HSL (Li *et al.*, 2007).

Une mutation dans le régulateur Vfr induit une diminution de transcription de *lasR* de près de 90% (Albus *et al.*, 1997). Il contrôle donc tous les gènes de virulence associés au système Las. Il est activé par l'AMPc et le GMPc bloquerait cette interaction (Fuchs *et al.*, 2010).

RsmA et DksA sont tous deux impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux gènes liés au QS. Dans de nombreuses bactéries, l'activation de la production de métabolites secondaires est dépendante de l'action post-transcriptionnelle de répresseurs se liant à l'ARNm (Haas et al., 2002), tels que RsmA (Repressor of Secondary Metabolism). Ces répresseurs régulent l'accès au site de fixation du ribosome et influencent la stabilité de l'ARN. Un mutant rsmA produit moins d'AHL, de pyocyanine et de cyanure d'hydrogène, et est affecté dans la pathogénicité et dans la production de nombreuses protéines extracellulaires chez P. aeruginosa (Pessi et al., 2001). Son régulon comprend près de 500 gènes dont les deux tiers sont régulés négativement. Au moins six opérons sont directement régulés par RsmA de manière négative, mais aucune régulation positive directe n'a été identifiée (Brencic & Lory, 2009).

Dans des conditions de carence en acides aminés, les bactéries activent un système particulier afin de court-circuiter certains de leurs systèmes dans le but de mieux survivre. Ce système est appelé «réponse stringente». Dans ces conditions, les bactéries accumulent de la guanosine tétraphosphate (ppGpp), qui intervient dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes. DksA est une protéine augmentant l'activité du ppGpp en se liant à l'ARN polymérase (Paul et al., 2004). Lorsque DksA est surexprimé, la transcription de rhll est fortement diminuée et les facteurs de virulence sont moins produits (Branny et al., 2001). DksA agit également sur la traduction de lasB, codant

pour une élastase, et de *rhlAB*, impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides (Jude *et al.*, 2003).

La polyphosphate kinase, encodée par *ppk*, est connue pour exercer un contrôle positif sur la synthèse des AHL et donc sur toute la virulence chez *P. aeruginosa* (Rashid *et al.*, 2000).

L'un des systèmes influençant le plus le QS chez *P. aeruginosa* est le système à deux composantes GacA/GacS. Le régulateur GacA est connu pour orchestrer la production de facteurs de virulence et d'antibiotiques dans de nombreuses bactéries (Lapouge *et al.*, 2008). Dans le genre *Pseudomonas*, l'impact du système GacA/GacS sur la virulence se fait *via* le contrôle de la production de petits ARN régulateurs qui se lient au régulateur RsmA (Brencic *et al.*, 2009; Lapouge *et al.*, 2008). C'est le cas des deux petits ARN *rsmY* et *rsmZ*, présents chez *P. aeruginosa* (Brencic *et al.*, 2009). De la même manière, d'autres études proposent que AlgR2, bien qu'impliqué dans la production d'alginate, soit également un régulateur transcriptionnel global influençant la totalité du QS, en se fixant de manière spécifique sur les régions promotrices de *lasR* et *rhlR* (Ledgham *et al.*, 2003a). Une présentation plus détaillée des facteurs intervenant sur le QS peut être consultée dans une revue récente (Williams & Camara, 2009).

3.1.3.2.2 Molécules-signal impliquées dans le quorum sensing

Les régulateurs ne sont pas les seuls facteurs régulant les gènes du QS. Ceux-ci sont souvent dépendants de ligands et autres composés présents dans différentes conditions environnementales auxquelles les bactéries sont exposées. Ces autres facteurs sont présentés dans cette sous-section.

3.1.3.2.2.1 Diversité des molécules-signal

Les AHL sont les molécules-signal les mieux connues pour établir un système de QS chez les bactéries à Gram négatif. Néanmoins, plusieurs autres familles de molécules ont été récemment identifiées comme molécules-signal intervenant dans le QS et n'appartenant pas aux AHL. C'est le cas des HAQ du système MvfR-PQS de P. aeruginosa. Xanthomonas campestris utilise quant à elle une petite molécule de faible poids moléculaire (l'acide cys-11-méthyl-2-dodécanoïque) qui diffuse et qui régule de nombreux facteurs de virulence (Buttner & Bonas, 2010). Ce signal fait partie d'une

famille nommée DSF (diffusible signal factor) détectée chez un nombre croissant de bactéries (Deng et al., 2010). Bien que P. aeruginosa ne produise pas de DSF, elle réagit néanmoins à sa présence en modifiant son organisation structurelle (Ryan et al., 2008). Enfin, Ralstonia solanacearum utilise l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxypalmitique en conjonction avec des AHL pour moduler l'activité de nombreux gènes (Flavier et al., 1997).

Chez *P. aeruginosa*, en plus des HAQ du système MvfR-PQS, plusieurs dipeptides cycliques ont été rapportés pour activer des régulateurs de type Lux impliqués dans le QS (Figure 3-4) (Holden et al., 1999). Leurs masses sont de 168 Da pour le cyclo(ΔAla-L-Val), de 260 pour le cyclo(L-Pro-Tyr) et de 244 pour le cyclo(L-Phe-L-Pro). Plusieurs enzymes sont impliquées dans leur métabolisme, bien que celles-ci n'aient pas encore été étudiées chez *P. aeruginosa*. Chez *Bacillus subtilis*, des synthases de peptides sont impliquées dans la synthèse non ribosomale d'antibiotiques peptidiques (Schneider & Marahiel, 1998). A proximité des opérons codant pour ces enzymes ou parfois au sein même de ceux-ci se trouvent, dans la très grande majorité des cas, des gènes possédant un domaine thioestérase. Celui-ci est requis pour l'addition du dernier acide aminé du peptide permettant sa cyclisation (Schneider & Marahiel, 1998). Il existe également des enzymes qui les clivent, comme c'est le cas de DppA chez *E. coli* (Holden *et al.*, 1999).

Figure 3-4. Structure de trois di-kéto-pipérazines produites par P. aeruginosa (Holden et al., 1999).

Enfin, des molécules-signal qui pourraient être échangées par des espèces bactériennes différentes ont aussi été découvertes. C'est le cas entre autres du diester du furanosylborate ou AI-2 chez Vibrio harveyi (Schauder et al., 2001). Cette molécule nécessite la présence du régulateur LuxS pour être synthétisée, dont des homologues ont

été trouvés dans près de la moitié des génomes bactériens séquencés. De plus, des centaines d'espèces synthétisent son précurseur, le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (Surette et al., 1999). Cette molécule –signal n'est pas produite par P. aeruginosa.

3.1.3.2.2.2 Le quorum quenching ou la dégradation des molécules-signal

De nombreux mécanismes d'interférence peuvent affecter les voies du QS. Des molécules biologiques structurellement semblables aux molécules-signal peuvent entrer en compétition pour le site de fixation de ces dernières sur les régulateurs qu'ils activent. Les furanones halogénées produites par l'algue rouge *Delisea pulchra* (Manefield *et al.*, 1999) peuvent ainsi empêcher l'activation du QS chez *Chromobacterium violaceum* (Martinelli *et al.*, 2004), chez *P. aeruginosa* (Hentzer & Givskov, 2003) ou chez *Vibrio harveyi* (Defoirdt *et al.*, 2008), en diminuant la stabilité des régulateurs de type LuxR (Manefield *et al.*, 2002).

Outre l'interférence au moyen d'inhibiteurs analogues aux molécules-signal, plusieurs espèces bactériennes utilisent des enzymes pour dégrader les AHL. Les lactonases et les décarboxylases clivent le noyau de l'homosérine lactone, tandis que les acylases et déaminases séparent la chaîne aliphatique de ce noyau (Dong & Zhang, 2005) (Figure 3-5). A ce jour, seules les acylases et les lactonases ont démontré une réelle efficacité à cliver les AHL (pour la liste de toutes les enzymes dégradant les AHL chez les bactéries, voir (Czajkowski & Jafra, 2009)).

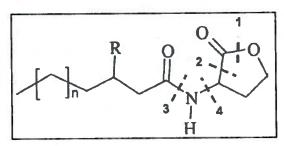


Figure 3-5. Mécanismes de dégradation enzymatique des acyl-homosérines-lactone (Czajkowski & Jafra, 2009).

Les lignes en pointillés indiquent les clivages possibles des AHL selon les enzymes suivantes : (1) lactonase ; (2) décarboxylase ; (3) acylase ; (4) déaminase.

L'une des lactonases les mieux caractérisées est AiiA, produite par le genre bactérien Bacillus. Deux domaines principaux ont été identifiés dans la séquence de

l'enzyme comme étant primordiaux pour son activité enzymatique : le premier, ¹⁰⁴HLHFDHAG¹¹¹, est caractéristique des métallo-β-lactamases, tandis que le second, ¹⁶⁵HTPGHTPGH¹⁷³, est un motif sur lequel se lie le zinc des métallo-hydrolases (Dong *et al.*, 2000). La présence du motif His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹-59X-His¹⁶⁹-21X-Asp¹⁹¹ est essentielle également et permet d'identifier les enzymes de la famille des AHL-lactonases (Czajkowski & Jafra, 2009).

Plusieurs acylases ont également été identifiées pour dégrader les AHL chez plusieurs espèces bactériennes (Roche *et al.*, 2004). Deux de celles-ci ont été découvertes chez *P. aeruginosa*. Les acylases PvdQ et QuiP clivent uniquement les AHL dont la chaîne aliphatique est supérieure à 8 carbones (Huang *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006). PvdQ est codée au sein d'un opéron de biosynthèse de la pyoverdine, ce qui suggère un rôle dans le métabolisme de ces composés également (Visca *et al.*, 2007). Elle a été cristallisée et caractérisée comme étant une hydrolase Ntn (amidohydrolase N-terminale nucléophile) (Bokhove *et al.*, 2010). Cette superfamille d'enzymes est caractérisée par une région catalytique nucléophile en N-terminal. Elles clivent les liens amides, possèdent une très faible homologie de séquence primaire et ont une structure secondaire αββα typique (Oinonen & Rouvinen, 2000). La poche enzymatique de PvdQ est particulièrement hydrophobe afin de pouvoir accueillir les AHL à longue chaîne. L'enzyme subit un léger changement de conformation en présence de 3-oxo-C₁₂-HSL, ce qui appuie l'hypothèse que cette molécule-signal soit l'un de ses substrats (Bokhove *et al.*, 2010).

3.1.3.2.3 Rôle des petits ARN régulateurs dans le quorum sensing

Outre les molécules-signal, d'autres facteurs peuvent intervenir dans l'activation ou la répression des régulateurs transcriptionnels influençant le QS. Les ARN non codants ou ARNnc sont des régulateurs globaux qui activent ou répriment un certain nombre de gènes de manière post-transcriptionnelle (Storz et al., 2005). Les ARNnc ont une taille allant de 50 à 400 nucléotides (Shimoni et al., 2007). Les premiers ont été découverts par hasard il y a une quarantaine d'années (Altuvia, 2007), mais leur étude plus systématique n'a pris d'essor qu'après les années 2000. Avec l'amélioration des techniques

bioinformatiques, des centaines de nouveaux candidats ont été identifiés à ce jour. Dans la seule bactérie *E. coli*, près de 80 ARNnc ont été confirmés (Waters & Storz, 2009).

3.1.3.2.3.1 Caractéristiques structurelles des ARNnc

Les ARNnc regroupent un nombre impressionnant de molécules aux fonctions, aux séquences et aux structures extrêmement diversifiées, ce qui complique considérablement leur caractérisation ou leur classification. Même les spécificités les plus rudimentaires, soit leur petite taille et l'absence de traduction sont remises en question avec la découverte d'un ARN de 514 nucléotides, RNAIII chez S. aureus, codant même pour un petit peptide, et dont les propriétés de régulateur ont été clairement établies (Benito et al., 2000; Boisset et al., 2007).

La prédiction de nouveaux ARNnc peut se faire en utilisant des logiciels bioinformatiques et en sélectionnant les paramètres les plus caractéristiques de ces molécules bien que, comme énoncé plus haut, ceux-ci ne permettront jamais de sélectionner la totalité des ARNnc. La génomique comparative est un outil utilisé pour leur identification. Premièrement, les régions intergéniques sont étudiées afin d'identifier d'éventuelles séquences conservées. Ensuite, celles-ci sont regroupées et alignées afin de déterminer une séquence consensus. Enfin, les séquences sont analysées afin d'identifier d'éventuels paramètres structuraux typiques des ARNnc, tels que les terminateurs rhoindépendants (Argaman et al., 2001).

Il existe deux voies de terminaison de transcription chez les bactéries. La première implique la participation du facteur rho, qui déstabilise le complexe de polymérase avec l'ARNm transcrit, ce qui libère ce dernier hors du complexe d'élongation. La seconde voie s'effectue en absence du facteur rho. Une séquence riche en GC et présentant une structure en épingle à cheveux suivie d'une région riche en uracile induit le décrochage de la polymérase et la fin de la transcription. Les terminateurs rho-dépendants sont peu caractérisés et n'ont aucune séquence consensus identifiable. Ils sont également moins répandus; tous les ARNnc identifiés à ce jour utilisent le mécanisme de terminaison intrinsèque rho-indépendant (Chen et al., 2002). Ces terminateurs peuvent donc être utilisés pour identifier de nouveaux ARNnc. Ils sont caractérisés par (de 5' à 3'): (1) une région de 11 nucléotides riche en adénosine, (2) une structure en épingle à cheveux de

longueur variable riche en GC, (3) une région de séparation de taille variable, (4) une région de 5 nucléotides riche en thymidine (partie proximale) et (5) une région distale de 7 nucléotides (Figure 3-6) (Lesnik *et al.*, 2001). Une liste de tous les terminateurs rhoindépendants détectés au moyen du logiciel TransTermHP chez la souche *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 est publiée et disponible (Kingsford *et al.*, 2007).

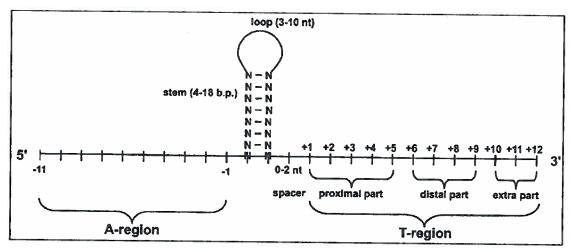


Figure 3-6. Schéma de la structure caractéristique d'un terminateur rho-indépendant selon (Lesnik et al., 2001).

L'identification des ARNnc est facilitée si sa régulation est connue. Chez Vibrio cholerae et V. harveyi, des chercheurs ont tenté d'identifier un facteur réprimant un régulateur transcriptionnel de leur système de QS, dépendant de la protéine de liaison à l'ARN Hfq et contrôlé par le régulateur LuxO et le facteur σ 54 (Lenz et al., 2004; Lilley & Bassler, 2000). C'est en recherchant les séquences promotrices sur lesquelles le facteur σ 54 se fixe et en sélectionnant celles relativement proches d'un terminateur rhoindépendant que plusieurs petits ARN régulateurs ont été identifiés (Lenz et al., 2004). Il en a été de même pour identifier les ARNnc prrF1 et prrF2 chez P. aeruginosa en identifiant les séquences intergéniques possédant un site de fixation du régulateur Fur ainsi qu'un terminateur rho-indépendant (Wilderman et al., 2004).

3.1.3.2.3.2 Mécanismes d'action des ARNnc sur les ARN messagers

Les ARNnc peuvent réprimer ou activer la traduction des ARNm. Les différents mécanismes d'action sont représentés à la Figure 3-7. Le mécanisme le plus commun est

l'appariement de l'ARNnc sur une région d'initiation de l'ARNm afin d'empêcher la fixation du ribosome sur celle-ci. C'est par exemple le cas d'oxyS chez *E. coli*. Cet ARNnc se fixe sur l'ARNm *fhlA* codant pour un régulateur transcriptionnel afin d'empêcher sa traduction (Altuvia *et al.*, 1998). L'hybridation de l'ARNnc sur l'ARNm peut également accélérer la dégradation de ce dernier. Le complexe est reconnu par une ribonucléase qui vient alors l'éliminer. C'est la manière dont l'ARNnc *ryhB* induit la dégradation de l'ARNm *sodB* (Massé & Gottesman, 2002). Les ARNnc peuvent toutefois jouer un rôle d'activation, en stabilisant un ARNm pour empêcher sa dégradation par une ribonucléase ou en s'hybridant sur un opérateur bloquant la traduction de celui-ci.

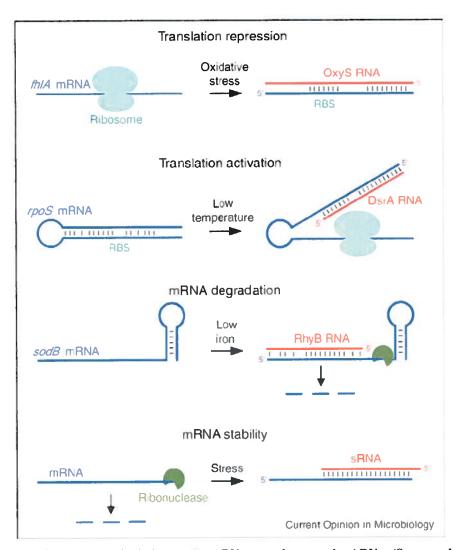


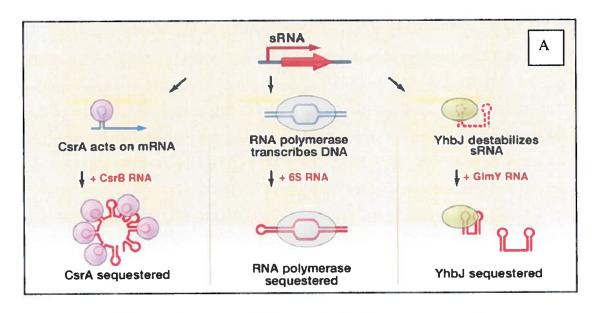
Figure 3-7. Mécanisme de régulation par les ARN non codants sur les ARNm (Storz et al., 2004).

3.1.3.2.3.3 Mécanismes d'action des ARNnc sur les protéines

Les ARNnc peuvent également agir directement sur des protéines pour les inactiver (Figure 3-8). CsrA est une protéine de liaison à l'ARN régulant la consommation de carbone et la motilité d'*E. coli* (Romeo *et al.*, 1993). Elle se fixe sur des motifs GGA des ARNm pour contrôler leur stabilité ou leur traduction. Les ARNnc *csrB* et *csrC* possèdent de nombreux motifs GGA (22 et 13, respectivement) qui leur permettent de séquestrer de nombreuses protéines CsrA (Liu *et al.*, 1997).

L'ARNnc 6S chez *E. coli* s'associe avec le facteur σ^{70} . Ce complexe active ou réprime un certain nombre de gènes (Wassarman, 2007a; Wassarman, 2007b). Dans ce cas, l'ARNnc 6S agit similairement à un ligand, nécessaire pour l'activité d'une protéine.

Enfin, le dernier exemple d'interaction entre un ARNnc et une protéine s'illustre avec l'ARNnc glmY et la protéine YhbJ. Deux ARN sont nécessaires pour activer la transcription de l'ARNm glmS, codant pour une glucosamine-6-phosphate synthase. GlmZ favorise la traduction de glmS en se fixant sur son ARNm, mais une autre protéine, YhbJ, interfère dans l'association entre glmZ et glmS en séquestrant glmZ. Le rôle de glmY est de séquestrer YhbJ. YhbJ ne peut alors plus bloquer glmZ. Celui-ci peut donc activer glmS (voir Figure 3-8B p. 180)(Reichenbach et al., 2008).



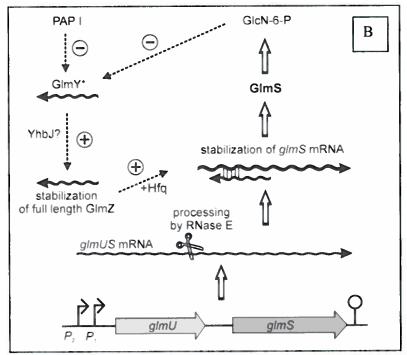


Figure 3-8. Mécanismes de régulation des ARNnc sur les protéines (Waters & Storz, 2009).

(A) Aperçu global de trois mécanismes de régulation; (B) Régulation de l'expression de glmS par glmY, glmZ et YhbJ chez E. coli (Reichenbach et al., 2008).

3.1.3.2.3.4 Implications des ARNnc dans le quorum sensing

Les systèmes de QS de plusieurs espèces du genre Vibrio ont été étudiés et détaillés en profondeur. Chez V. harveyi et V. cholerae, les molécules-signal du QS sont reconnues

par des senseurs kinases-histidine à deux composantes (Figure 3-9). Ces senseurs transmettent l'information perçue au régulateur LuxO. Ainsi, en présence d'une faible concentration de molécules-signal, le groupement phosphate est transféré de LuxU à LuxO, qui lui-même réprime indirectement l'activateur principal du QS: LuxR (V. harveyi) ou HapR (V. cholerae). À forte densité cellulaire, lorsque les molécules-signal sont suffisamment concentrées, les senseurs déphosphorylent et inactivent LuxO, ce qui permet alors l'expression des activateurs du QS (Bejerano-Sagie & Xavier, 2007).

Chez V. cholerae, lors d'une étude sur les facteurs influençant les régulateurs de type LuxR, la protéine Hfq a été identifiée (Lenz et al., 2004). Celle-ci est une protéine de liaison à l'ARN et est connue pour contrôler de nombreux ARNnc au sein de beaucoup d'espèces bactériennes en les stabilisant telle une chaperonne (Valentin-Hansen et al., 2004; Zhang et al., 2003). Ainsi, quatre ARNnc d'une longueur de 110 nucléotides environ et appelés qrr1-4 ont été découverts. Ce sont les premiers ARNnc reconnus pour influencer le QS dans une bactérie à Gram négatif. Chez V. harveyi, ces ARNnc sont au nombre de cinq (Tu & Bassler, 2007).

Lorsque LuxO est phosphorylé, il induit l'expression des ARNnc qrr. Ceux-ci s'associent à Hfq et se lient directement sur l'ARNm *luxR* de *V. harveyi* ou *hapR* de *V. cholerae* pour empêcher leur traduction (Tu & Bassler, 2007). Ils jouent donc un rôle de répression sur le QS de *Vibrio* (Figure 3-9).

Enfin, le QS de *V. cholerae* est influencé par un autre groupe d'ARNnc. Le système VarS-VarA est un système à deux composantes agissant également sur les régulateurs du QS. Celui-ci active la transcription de ARNnc appelés *csrB*, *csrC* et *csrD*, dont la fonction est de séquestrer CsrA (Lenz *et al.*, 2005). CsrA active, selon un mécanisme encore inconnu, le répresseur LuxO, pour réprimer le QS à faible densité cellulaire. A forte densité, les ARNnc *csrBCD* sont transcrits et empêchent l'activation de LuxO par CsrA (Figure 3-9).

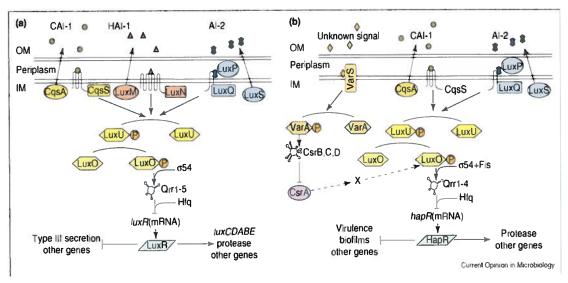


Figure 3-9. Rôle des ARNnc dans le QS chez (A) V. harveyi et (B) V. cholerae (Bejerano-Sagie & Xavier, 2007).

3.1.3.2.3.5 Petits ARN régulateurs contrôlant le QS chez P. aeruginosa

On retrouve également un contrôle du QS de *P. aeruginosa* par des ARNnc régulateurs. Le système VarS-VarA de *V. cholerae* possède un homologue nommé GacS-GacA chez *P. aeruginosa*. Le signal détecté par la kinase-senseur GacS n'est pas encore connu, mais plusieurs autres facteurs tels que les kinases-senseur RetS et LadS interagissent avec lui et interviennent dans l'induction ou la répression du système GacS-GacA, comme cela a été démontré chez *P. aeruginosa* et chez *P. fluorescens* (Goodman *et al.*, 2009; Ventre *et al.*, 2006; Workentine *et al.*, 2009). La température est un facteur qui stimule RetS et qui affecte ainsi le système GacS-GacA, du moins chez *P. fluorescens* (Humair *et al.*, 2009).

Le régulateur GacA, une fois activé par GacS, active la transcription de deux ARNnc appelés rsmY et rsmZ, homologues à csrB (Brencic et al., 2009). RsmA, l'homologue de CsrA, est ainsi séquestré par ces ARNnc qui l'empêchent de réprimer de manière post-transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans la virulence de P. aeruginosa (Kay et al., 2006) (Figure 3-10). Par contre, seul rsmY se fixe à Hfq (Sonnleitner et al., 2006). Cela suggère qu'il puisse avoir un mode d'action différent de celui de rsmZ qui n'est pas stabilisé par cette chaperonne.

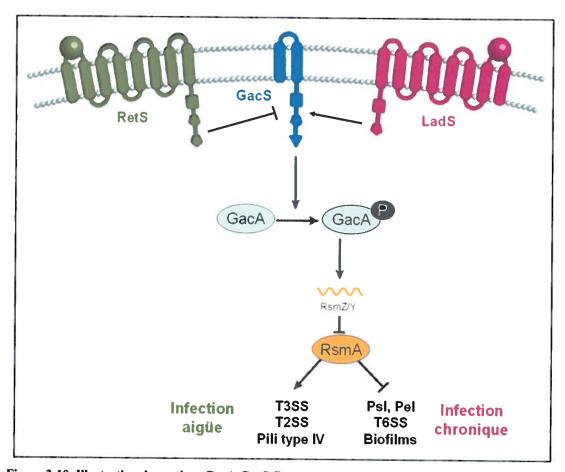


Figure 3-10. Illustration du système GacA-GacS-RsmA-rsmYZ de P. aeruginosa, adaptée de (Records & Gross, 2010).

Symboles représentés dans la structure de LadS, RetS et GacS: carrés: domaine histidine-kinase; pentagones: domaine régulateur; sphère: domaine senseur au niveau du périplasme; triangle: domaine de phosphotransfert contenant une histidine. Psl et Pel: exopolysaccharides impliqués dans la formation de biofilms. TxSS: Systèmes de sécrétion de type x (x =2, 3 ou 6). P: groupement phosphate. Ce système affecte également de nombreux autres facteurs de virulence tels que le HCN, les lectines, les phénazines et la chitinase (non représentés) (Pessi et al., 2001).

3.1.4 Objectifs du projet

3.1.4.1 Objectifs spécifiques au chapitre

Tel que présenté dans la section Introduction (point 3.1) de ce chapitre, on sait que PqsE agit sur trois voies chez *P. aeruginosa*: il contrôle positivement la production des phénazines, dont la pyocyanine, il génère un stress oxydatif et il active de nombreux gènes du QS. Il reste à présent à déterminer si ces voies sont directement ou indirectement régulées par PqsE.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

- Étudier la structure primaire et secondaire de PqsE et déterminer son appartenance à l'une des sous-familles des hydrolases dépendantes du zinc. Résultats présentés dans la section 3.3.1, p. 204. Ceci est nécessaire pour définir les propriétés du substrat éventuel de PqsE et pour cibler la fonction enzymatique de PqsE.
- 2. Approfondir la compréhension du mutant pqsE d'un point de vue métabolomique, phénotypique et protéomique. Résultats présentés dans la section 3.3.2, p. 212. Ceci permet de peaufiner les connaissances sur l'effet de PqsE au sein de la cellule, et donc de restreindre la liste des substrats potentiels sur lesquels cette enzyme agit, en identifiant les cibles possibles selon les effets observés.
- 3. Identifier le substrat naturel de PqsE, lié au QS. Résultats présentés dans les sections 3.3.3 à 3.3.6. Cette identification déterminerait l'étape subséquente à celle de PqsE dans la régulation des gènes liés au QS.

3.1.4.2 Méthodologie et approche globale

Identifier le substrat naturel de la protéine PqsE permettrait de déterminer la famille d'hydrolases à laquelle appartiendrait cette enzyme hypothétique. Différents composés typiquement hydrolysés par ces différentes familles seront testés chez le mutant *pqsE* ainsi que chez la souche sauvage afin de comparer la réponse cellulaire en présence ou en absence de PqsE.

Le mutant pqsE sera soumis à une comparaison poussée avec la souche sauvage. Des analyses phénotypiques, transcriptionnelles, protéomiques par gel bidimensionnel et métabolomiques par LC-MS seront réalisées afin d'identifier les différences entre ces deux souches. Les molécules hydrolysables impliquées dans le QS de P. aeruginosa telles que les AHL, les HAQ et les ARNnc seront étudiées tout particulièrement afin d'établir un lien éventuel avec PqsE. Des mutagenèses aléatoires seront effectuées afin d'identifier le plus largement possible le facteur sur lequel PqsE exercerait sa fonction. Enfin, une technique d'hybridation soustractive a également été mise au point afin d'identifier d'éventuels ARNnc impliqués dans la voie de régulation par PqsE.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Souches et conditions de culture

Les listes des souches et des vecteurs utilisés dans ce chapitre sont présentées dans Appendice B et Appendice D, respectivement. Les conditions générales de culture sont identiques à celles présentées dans le chapitre 2. Les milieux solides sont réalisés en ajoutant 1,5% d'agar au milieu liquide. Les antibiotiques sont utilisés le cas échéant, aux concentrations requises pour *P. aeruginosa* (tétracycline : 125 mg/l en milieu solide, 75 mg/l en milieu liquide, carbénicilline : 300 mg/l, kanamycine : 200 mg/l).

Les différentes molécules commerciales utilisées dans ce chapitre sont présentées dans le Tableau 3-3. L'acide anthranilique est toujours ajouté lorsque la biosynthèse des HAQ s'amorce, c'est-à-dire lorsque la culture bactérienne atteint une $DO_{600} = 2$ en milieu TSB, et ce afin de limiter son utilisation dans d'autres voies métaboliques telles que celle de synthèse du tryptophane.

Tableau 3-3. Liste des molécules utilisées dans ce chapitre.

Nom du composé	Concentration utilisée	Origine
Acide 1-décane sulfonique	50 à 450 mM (Hanson et	Sigma
	al., 2004)	
Acide 5-fluoro-orotique (5-	0,2 à 2 mM (Ueda et al.,	Cedarlane
FOA)	2009)	
Acide anthranilique	20 à 200 mg/l	Sigma
Captopril	3 à 7,5 mM	Sigma
Cumène hydroperoxyde	500 μM (Ochsner et al.,	Sigma
(CHP)	2000)	
Méthylglyoxal	0,5 mM	Sigma
Pyocyanine	20 mg/l	Purification au laboratoire
Paraquat	100 μM (Kobayashi &	Sigma
	Tagawa, 2004)	
Tert-butyl-hydroperoxyde	500 μΜ	Sigma
(tBHP)		_

La pyocyanine a été extraite comme suit. Le mutant *lasR*, qui surproduit la pyocyanine en fin de phase stationnaire, est cultivé durant 24 h à 34°C sous agitation, dans le milieu A de King *et al.*, (King *et al.*, 1954). La culture est extraite trois fois au

chloroforme avec le tiers de son volume. Le chloroforme contenant la pyocyanine est extrait 3 fois avec du HCl 0,2 N (ratio 99:1). La fraction aqueuse est récupérée et neutralisée au NaOH 2N jusqu'à l'obtention d'une solution bleue. Celle-ci est à nouveau extraite au chloroforme. Le chloroforme est ensuite déshydraté au Na₂SO₄ puis évaporé à sec.

Pour les tests de confirmation des résultats des Phenotype MicroarraysTM, le milieu Biolog a été utilisé : 2 g/l tryptophane, 1 g/l extrait de levure, 1 g/l NaCl.

3.2.2 Quantification de l'activité beta-galactosidase

Les souches contenant le rapporteur transcriptionnel d'intérêt sont cultivées en présence de l'antibiotique de sélection pour une douzaine d'heures. Elles sont ensuite diluées à DO₆₀₀ = 0,05 dans du milieu frais en absence d'antibiotique pour le suivi de l'activité beta-galactosidase, et en présence de certains composés dont on veut étudier l'effet sur la transcription du gène suivi. Le suivi de l'activité beta-galactosidase est réalisé selon les méthodes déjà publiées (Miller, 1972). Les expériences sont réalisées en triplicata. Le substrat enzymatique utilisé, l'ONPG (ortho-nitro-phényl-B,D-galactopyranodide), est fourni par Fisher.

Pour les tests en présence d'inducteurs de stress oxydatif, les réactifs sont ajoutés et l'activité beta-galactosidase a été quantifiée après 30 min. pour les hydroperoxydes organiques et après 10 min. pour le peroxyde d'hydrogène, selon les méthodes publiées précédemment (Ochsner *et al.*, 2000).

3.2.3 Phenotype MicroarraysTM

Un échantillon de culture des souches PA14, pqsE, rhlR et phzC1 C2 a été envoyé à la compagnie Biolog (Hayward, Californie). La description de la méthode utilisée peut être consultée sur le site http://www.biolog.com/phenoMicro.html. Les fichiers contenant les résultats de comparaison et fournis par la compagnie sont inclus en Appendice F.

3.2.4 Analyse de la résistance au stress oxydatif

Un sensi-disque pour les tests de sensibilité antimicrobienne BBLTM (BD Biosciences) est imbibé d'une solution de peroxyde d'hydrogène 3% ou de paraquat 1

mM. Le disque est déposé sur une gélose LB préalablement inoculée en tapis avec $100~\mu l$ d'une préculture des différentes souches à tester. Les géloses sont ensuite incubées à 37° C pour une douzaine d'heures.

3.2.5 Analyse du protéome de pqsE par gel bidimensionnel

Les mutants pqsE et phzM sont cultivés dans 200 ml de TSB à 37°C et 240 rotations par minute (rpm). Les cultures sont arrêtées à une $DO_{600} \approx 4$. Les cellules sont centrifugées à 10 000 x g durant 10 min. puis lavées avec deux fois 100 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH7,5. Elles sont ensuite resuspendues dans 5 ml du même tampon, et 200 μ l d'inhibiteur de protéases concentré sont ajoutés.

Seule la fraction intracellulaire du protéome a été étudiée. Les cellules sont soniquées trois fois 30 sec. à une amplitude de 3%. Puis, la solution est centrifugée à 18 000 x g et le surnageant est ultracentrifugé à 40 000 x g durant 30 min. à 4°C. Le surnageant obtenu est passé sur un filtre de 0,22 µm. Les protéines en suspension sont précipitées avec de l'acide 2,2,2-trichloroacétique (TCA) 40% pour une concentration finale à 20%. Après une centrifugation à 19 000 x g durant 30 min. à 4°C, le culot obtenu est lavé à l'acétone puis recentrifugé à 17 000 x g pendant 15 min. Ce lavage est répété quatre fois. Le culot obtenu est séché puis redissous dans un tampon de réhydratation (8 M urée, 2 M thio-urée, 4% p/v CHAPS (3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid). 40 mM dithiothreitol (DTT), 20 tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)). La concentration en protéines est ensuite dosée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec le kit de Bio-Rad après redissolution. Environ 100 µg de protéines par échantillon sont mélangés avec un tampon IPG 3-10 (GE Healthcare) et 0,0025% de bleu de bromophénol pour un volume final de 250 µl. La solution est chargée sur une bande de gel Immobiline Dry Strip (échelle de pH 3-10 linéaire, GE Healthcare) pour chaque échantillon. Les deux bandes de gel sont couvertes d'huile minérale et réhydratées pendant 12 heures à température ambiante. Elles sont ensuite soumises à un courant total de 19,5 kVhr à 20°C dans un système IPGphor (GE Healthcare). Les bandes sont incubées durant 10 min. dans deux tampons d'équilibration (premier : 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 contenant 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 6 M urée, 30% glycérol et 1% p/v DTT; second: 2% SDS, 6M urée, 30%

glycérol et 2,5% iodoacétamide dans 50 mM Tris-HCl, pH 8,8). Chaque bande est alors transférée dans un gel à 12% de polyacrylamide. L'électrophorèse se déroule à 75 V pour une douzaine d'heures. Les protéines sont finalement révélées par une coloration à l'argent, excisées, décolorées et digérées à la trypsine pour être séquencées par spectrométrie de masse (Shevchenko et al., 1996) par le service de protéomique de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Le séquençage des peptides et l'identification des protéines sont réalisés avec un spectromètre de masse triple quadrupôle à trappe ionique (2000 Q-trap©, Applied Biosystems/MDS SCIEX) couplé à un Nano-LC (Agilent). La comparaison de séquence avec les banques de données est réalisée avec le logiciel Mascot 2.0 (Matrix Science).

3.2.6 Marquage des dérivés de l'acide anthranilique au ¹⁴Carbone

Des cultures de 100 ml de la souche sauvage PA14 et du mutant pqsE sont supplémentées avec 20 μ Curie d'acide anthranilique marqué au ¹⁴C (12,5 mCi/mmol) sur son noyau (Sigma), à une DO₆₀₀ = 2 (afin d'éviter que l'acide anthranilique ajouté ne serve à produire d'autres composés, il n'est ajouté que lorsque la biosynthèse des HAQ s'amorce). Lorsqu'elles atteignent la fin de la phase exponentielle (DO₆₀₀ = 3,5), 50 ml sont prélevés et centrifugés. Les 50 autres ml sont centrifugés lorsqu'elles atteignent le début de la phase stationnaire (DO₆₀₀ = 5). Pour chacun des 4 échantillons de 50 ml obtenus, la phase non polaire est récupérée par extraction du surnageant total à l'acétate d'éthyle (voir section 2.2.2.1 p. 69). Elle est concentrée par évaporation puis redissoute dans 100 μ l d'acétate d'éthyle (la phase aqueuse restante tient lieu de fraction extracellulaire polaire).

3.2.7 Séparation et analyse des fractions intracellulaires et extracellulaires, polaires et non polaires

Les cultures bactériennes sont cultivées jusqu'à obtention de la DO₆₀₀ désirée. Elles sont ensuite centrifugées. Le surnageant obtenu est la fraction extracellulaire, le culot est la fraction intracellulaire et membranaire. La fraction extracellulaire est analysée directement par LC-MS ou par chromatographie en couche mince (TLC). Les molécules polaires et non polaires peuvent être séparées par extraction à l'acétate d'éthyle (voir

section 2.2.2.1, p. 69). Pour obtenir la fraction intracellulaire, le culot des cultures est redissous dans l'eau dans 1/10 du volume de culture initial et lysé par un processus de gel-dégel au cours duquel des bactéries sont soumises à une alternance de températures allant de 50°C à plusieurs dizaines de degrés sous 0°C (bain de glace sèche/éthanol). Les composés non polaires ont ensuite été récupérés par extraction à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse restante après l'extraction constitue la fraction intracellulaire polaire. Celle-ci est centrifugée pour éliminer les membranes et autres débris cellulaires en vue d'être analysée par chromatographie ou par spectrométrie.

3.2.8 Chromatographie sur couche mince (TLC)

3.2.8.1 TLC (pour la séparation de molécules non polaires)

La TLC est effectuée sur une plaque de silice (Whatman, num. cat. 4861-840) tenant lieu de phase stationnaire et différents solvants organiques sont utilisés comme éluants. Une partie (25 µl) de l'échantillon non polaire est posée en un point sur la plaque de silice. Selon son affinité pour la phase mobile ou stationnaire, chaque molécule présente dans l'échantillon migre plus ou moins loin sur la plaque. Une première migration est effectuée avec 90% dichlorométhane et 10% méthanol. Au besoin, plusieurs séparations additionnelles sont faites par la suite. Les mélanges de solvants utilisés sont : pour la deuxième séparation : 70% d'acétate d'éthyle et 30% d'acétonitrile ; 3ème séparation : 25% acétate d'éthyle, 25% hexanes, 25% acétonitrile et 25% éther ; 4ème séparation : 95% acétate d'éthyle et 5% hexanes.

3.2.8.2 TLC en phase inverse(séparation des molécules polaires)

Dans le cas des TLC en phase inverse (Whatman, num. cat. 4801-600), la phase mobile est significativement plus polaire que la phase stationnaire. Cette dernière possède des chaînes alkyles (C₁₈) liées de manière covalente, ce qui inverse l'ordre d'élution. Les molécules polaires migrent donc plus aisément que les non polaires.

Dans le cas de migration de composés radioactifs, la plaque de silice est exposée pendant 4 heures au *phosphorlmager SI* (Molecular Dynamics). Un *phosphorlmager* est un système de détection de petites quantités radioactives, dont la technique est basée sur la capacité que possède le phosphore de stocker la radioactivité.

Si l'un des composés présents sur la plaque chromatographique est intéressant, il peut être extrait. La silice de la plaque est grattée à l'endroit où la molécule a migré. Une surface de taille similaire est également grattée dans la région supérieure de la plaque afin de servir de témoin négatif. La molécule est ensuite extraite de la silice avec un solvant contenant 20% méthanol et 80% acétate d'éthyle, qui est ensuite évaporé à sec et redissous dans une solution de 30% acétonitrile 1% HCl pour être injecté au LC-MS.

3.2.9 Analyses par LC-MS

Les conditions de détection des HAQ sont présentées au chapitre 2 (section 2.2.7, p. 71). Ces mêmes conditions ont été utilisées pour détecter les dipeptides cycliques (m/z +1 de 245, 261 et 169, voir Figure 3-4 p. 173) et les AHL. Les conditions de détection optimisées pour les molécules plus polaires telles que le DHQ et le VD279 sont présentées dans l'article sur le DHQ (Lépine *et al.*, 2007) dans l'Appendice E.

3.2.10 Bioessai pour la détection des acyl homosérine lactones

Le protocole élaboré pour la détection par *C. violaceum* des AHL de *P. aeruginosa* est basé sur celui publié par Ravn et ses collègues (Ravn et al., 2001). La souche de C. violaceum utilisée est le double mutant CV026. Celui-ci a été obtenu par mutagenèse aléatoire et possède une double insertion du transposon mini-Tn5 dans un gène homologue de *lux1* appelé *cvi1* et dans un locus répresseur putatif (McClean et al., 1997). Ce mutant ne produit pas l'auto-inducteur du système de QS chez *C. violaceum*, le *N*-hexanoyl-L-homosérine lactone ou HHL. Si cet auto-inducteur est rajouté dans la culture de CV026, la production de violacéine est restaurée. De plus, les études du Dr. McClean ont révélé que la violacéine est induite à degrés divers par la présence d'autres AHL de chaîne aliphatique inférieure à huit carbones, tandis qu'elle est inhibée en présence d'AHL à chaîne aliphatique supérieure à dix carbones. *C. violaceum* peut donc être utilisé pour détecter la présence d'AHL dans un échantillon donné.

Des cultures de PA14 et du mutant *pqsE* sont incubées en milieu TSB, et 25 ml sont prélevés aux DO₆₀₀ de 2 et de 4,5. La culture subit un processus de gel-dégel afin de lyser les cellules et de libérer la fraction intracellulaire. La fraction non polaire comprenant les AHL intra- et extracellulaires est ensuite récupérée par extraction à

l'acétate d'éthyle (voir section 2.2.2.1 p. 69), concentrée par évaporation puis redissoute dans 100 μl de solvant. L'échantillon est ensuite posé sur plaque TLC et élué avec un solvant composé de 50% acétate d'éthyle et de 50% hexane. Une fois la migration effectuée, la plaque est séchée pour éliminer les résidus de solvant puis recouverte de 20 ml de milieu LB 1% d'agar maintenu à 42°C et contenant 2 ml d'une culture de *C. violaceum* CV026. Après 24 heures d'incubation à 30°C, la présence d'AHL à courte chaîne carbonée est détectée par la présence de taches violacées sur la plaque chromatographique. Dans le cas de la détection des AHL à chaîne carbonée égale ou supérieure à 10 carbones, le protocole reste identique, mais 500 nM d'une solution de C₄-HSL sont rajoutés dans le milieu LB contenant CV026. Après incubation, la violacéine produite recouvre la totalité de la plaque à l'exception des zones contenant une ou plusieurs AHL à longue chaîne carbonée. Afin de séparer davantage les AHL sur la plaque, un solvant composé de 70% acétate d'éthyle et de 30% hexane est utilisé comme éluant.

3.2.11 Biologie moléculaire

Les amorces utilisées dans ce chapitre ainsi que les températures d'hybridation qu'elles requièrent sont reprises dans l'Appendice C. Les amplifications PCR sont réalisées selon les protocoles réguliers, avec un temps d'élongation de 1 min. pour 1000 paires de bases. La concentration de chacune des amorces utilisées pour l'amplification est de 10 pM et la concentration de dNTP est de 10 mM. Du DMSO (10%) est également ajouté. Dans le cas de produits PCR marqués à la digoxygénine, les dNTP utilisés sont ceux provenant du PCR DIG Labeling Mix (Roche 11 585 550 910) contenant de la digoxygénine-11-dUTP.

Les digestions enzymatiques se font selon les instructions du fournisseur (NEB).

3.2.11.1 Extraction d'ADN plasmidique

Une culture contenant le vecteur d'intérêt est cultivée durant la nuit en présence de l'antibiotique adéquat. Deux millilitres de culture sont centrifugés durant une min. à 16 000 x g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A, pH8,0, H₂O). Le tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) est ensuite ajouté à raison de 200 µl afin de lyser les cellules. La

solution est mélangée par inversion jusqu'à ce qu'elle devienne homogène, claire et visqueuse. Elle est incubée à température ambiante durant 2 min. avant d'y ajouter 200 µl de tampon P3 (3 M acétate de potassium, acide acétique pour un pH de 5,5). La solution est à nouveau mélangée par inversion pour précipiter l'ADN génomique et les débris cellulaires. Elle est incubée à température ambiante pendant 2-3 min. avant d'être centrifugée 10 min. à 16 000 x g. Le surnageant est récupéré et mélangé avec un volume égal d'isopropanol. Après 2-3 min. d'incubation à température ambiante, la solution est centrifugée durant 30 min. Le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%. Il est ensuite resuspendu dans de l'eau milli-Q et l'ADN qu'il contient est quantifié au spectrophotomètre (Nanodrop). La solution est conservée à -20°C.

3.2.11.2 Extraction d'ADN génomique

Deux millilitres d'une culture bactérienne sont centrifugés durant 3 min. Le culot est suspendu dans 200 µl de tampon de lyse (40 mM TRIS, 20 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, 1% SDS) et 66 µl de NaCl 5 M. La solution est centrifugée durant 10 min. Le surnageant est récupéré et mélangé avec 300 µl chloroforme. Il est centrifugé 3 min. et est à nouveau extrait au chloroforme. Le surnageant est enfin précipité à l'éthanol (voir point 3.2.11.3.2 p193) et resuspendu dans de l'eau. Pour le SCOTS, les meilleurs rendements en termes de quantité et de purification ont été obtenus en utilisant le kit Gentra Puregene (Qiagen) de purification d'ADN génomique.

3.2.11.3 Extraction d'ARN

3.2.11.3.1 Purification des acides nucléiques

Les cultures bactériennes d'intérêt sont cultivées jusqu'à l'obtention de la DO₆₀₀ voulue. Les souches utilisées pour le 2D-PAGE sont les souches *pqsE* et PA14 (pDN19*pqsE*). Celles-ci sont cultivées en milieu TSB (3 x 5 ml) jusqu'à apparition de pyocyanine chez la souche sauvage, qui témoigne de l'action de PqsE dans la cellule, c'est-à-dire vers une DO₆₀₀ de 3. Pour le SCOTS, les souches utilisées sont *pqsE* et PA14, dans 3 ml de milieu King A à une DO₆₀₀ de 3.

Les cultures sont centrifugées durant 10 min. à 16 000 x g. Le culot bactérien est suspendu dans 300 μl de tampon de lyse (40 mM TRIS, 20 mM CH₃COONa, 1mM EDTA, pH 7-7,8, 1% SDS, eau DEPC) et 100 μl de NaCl 5 M. Du phénol (500 μl) est mélangé à la solution puis le tout est centrifugé durant 10 min. L'extraction au phénol est répétée deux fois sur la phase aqueuse. Cette dernière est ensuite récupérée et mélangée avec 300 μl de chloroforme puis les phases sont séparées par centrifugation durant 3 min. La phase aqueuse est alors conservée pour l'étape de précipitation. Pour le SCOTS, le culot est directement suspendu dans 400 μl de Trizol (Invitrogen) et incubé à 65°C pendant 10 min. Ensuite, 80 μl de chloroforme sont ajoutés. La solution est centrifugée durant 20 min. à 15 000 x g. La phase aqueuse est alors récupérée pour les étapes subséquentes de précipitation à l'éthanol.

3.2.11.3.2 Précipitation des acides nucléiques à l'alcool

De l'acétate de sodium 3 M est ajouté au mélange ADN-ARN dans un ratio 1/10. Du glycogène est ajouté pour une concentration finale de 0,025 μg/μl lors de la précipitation de petites séquences. La solution est ensuite précipitée avec 2 volumes d'éthanol 95%, refroidie, puis centrifugée durant 30 min. Dans le cas du SCOTS, la solution est refroidie à -80°C pour minimum 60 min. Le culot est lavé avec 500 μl d'éthanol 70% et centrifugé à nouveau durant 5 min. à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé pour laisser le culot sécher durant 30 min. Celui-ci est enfin dissous dans 150 μl d'eau DEPC. La concentration en acides nucléiques est évaluée par spectrophotométrie (Nanodrop) (environ 500 ng/μl).

3.2.11.3.3 Traitement à la DNase pour éliminer l'ADN

Environ 5 μg du mélange ADN-ARN est incubé avec 2 μl tampon DNase (TRIS-HCl 1M pH7,5, MgCl₂ 100 mM), 2 μl DNase I (Roche 04 716 728 001, 10 unités/μl) et ajusté à 20 μl avec de l'eau. La solution est incubée à 37°C durant 1 h. L'enzyme est ensuite inactivée en présence de 1 μl EDTA 25 mM à 70°C durant 10 min. L'ARN est finalement précipité à l'éthanol (voir la section 3.2.11.3.2 ci-dessus). L'ARN est quantifié au spectrophotomètre (Nanodrop).

3.2.11.4 Construction des mutants qscR⁻

Une séquence du gène qscR située de +140 à +558 en aval du codon d'initiation de la traduction, a été amplifiée à partir de l'ADN chromosomique de la souche sauvage PA14 (kit Wizard® SV Genomic DNA de Proméga). Des séquences de reconnaissance pour les enzymes de restriction HindIII en amont et EcoRI en aval sont ajoutées aux amorces. L'amplicon est digéré puis ligué dans le vecteur pNTPS138 digéré au préalable par ces mêmes enzymes, pour former le vecteur pNTPS138qscR. Celui-ci est électroporé dans E. coli DH5α, et la présence de la séquence de qscR est confirmée par extraction d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes HindIII et EcoRI. Ce nouveau vecteur est électroporé chez la souche S17-1 λpir de E. coli (Simon et al., 1983). Il est ensuite transféré dans les souches de P. aeruginosa par conjugaison bactérienne (Choi et al., 2006) pour générer les mutants qscR et pqsE qscR, résistants à la kanamycine.

3.2.11.5 Construction et utilisation du vecteur mini-CTX-phzA1-lacZ

3.2.11.5.1 Construction du mini-CTX-phzA1-lacZ

Afin d'identifier les facteurs influençant négativement la transcription de l'opéron phzA1B1C1D1E1F1G1, le promoteur de l'opéron est intégré dans un vecteur appelé mini-CTX-lacZ. Ce vecteur a été créé pour faciliter l'intégration de gènes à l'intérieur d'un site spécifique (attB) sur le chromosome de P. aeruginosa (Becher & Schweizer, 2000). Outre une origine de réplication fonctionnelle dans E. coli (ori) et un gène de résistance à la tétracycline, ce vecteur contient également : (i) le gène int codant pour l'intégrase fCTX, (ii) le site d'attachement attP qui permettra l'insertion du vecteur dans le site attB du chromosome, (iii) des sites reconnus par la recombinase Flp, qui permettront d'éliminer les séquences non désirées du matériel génétique intégré dans le chromosome, ainsi que (iv) le gène lacZ dénué de promoteur, en aval d'un site de clonage multiple. Le miniCTX-lacZ est donc un outil facilitant la construction de rapporteurs transcriptionnels lacZ insérés sur le chromosome dans un site considéré non-perturbateur («silencieux»).

Les amorces utilisées pour amplifier le promoteur des gènes *phzA1-G1* sont les amorces OppF et OppR (voir Appendice C). Elles amplifient une région de 708 paires de bases comprise entre les nucléotides 813809 et 813103 du génome de PA14 et incluant la

région intergénique entre phzM et phzA1, ainsi que quelques dizaines de nucléotides du gène phzA1. L'amorce OppF possède également un site de restriction reconnu par l'enzyme XhoI, l'amorce OppR un site reconnu par l'enzyme PstI. La région amplifiée est digérée par ces deux enzymes puis liguée dans le vecteur mini-CTX-lacZ également prédigéré. Le nouveau vecteur mini-CTX-phzA1-lacZ est électroporé chez la souche d'E. coli DH5α, où la présence de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique. Le vecteur est ensuite extrait puis électroporé chez la souche SM10 λpir, qui sert de souche donneuse pour la conjugaison avec la souche sauvage PA14 et le mutant pqsE (Choi et al., 2006). Ce vecteur s'intègre à l'intérieur d'un site spécifique (attB) sur le chromosome de P. aeruginosa (Becher & Schweizer, 2000). Les transformants de PA14 présentent une résistance à la tétracycline (125 mg/l) ainsi qu'une production du composé bleu insoluble 5-bromo-4-chloro indigo en présence de X-gal (due à l'activation du promoteur phz1 chez la souche sauvage). Ceux obtenus à partir du mutant pqsE sont également résistants à la tétracycline et ne présentent qu'une légère pigmentation due à une transcription non-spécifique du gène lacZ.

3.2.11.5.2 Excision du mini-CTX hors du chromosome et conservation du rapporteur transcriptionnel phzA1-lacZ

Le vecteur miniCTX-lacZ possède deux sites FRT, présents de part et d'autre de la séquence contenant la fusion lacZ et le site attB, que peut reconnaître la recombinase Flp. Le vecteur pFLP2 est un vecteur construit par l'équipe du Dr. Schweizer (Hoang et al., 1998). Il contient le gène flp codant pour la recombinase, un gène de résistance aux β-lactames (bla) ainsi qu'un gène codant pour une levansucrase, conférant une sensibilité au sucrose (sacB). Ce vecteur est électroporé dans les nouvelles souches PA14 (phzA1-lacZ) et pqsE- (phzA1-lacZ) afin de les rendre sensibles à la tétracycline. La flipase reconnaît les deux sites FRT situés de part et d'autre de la fusion phz1-lacZ dans le vecteur miniCTX, et excise de cette manière les séquences non voulues de ce vecteur. Les colonies obtenues présentant une sensibilité à la tétracycline (perte des séquences du mini-CTX) ainsi qu'une coloration bleue (pour PA14-phz1-lacZ) ou blanche (pour pqsE phz1-lacZ) en présence de X-gal sont retenues. Celles-ci sont incubées dans un milieu LB

liquide pour quelques heures, puis étalées sur gélose LB sans NaCl contenant 5% de sucrose afin de sélectionner pour la perte du vecteur pFLP2. Les colonies présentant une croissance supérieure à la moyenne en présence de sucrose sont alors testées afin de vérifier leur sensibilité à la carbénicilline (perte du vecteur pFLP2). La bonne localisation de l'insert dans le génome est confirmée par PCR en utilisant deux amorces (pser-down (Hoang et al., 2000) et oppR) amplifiant une région comprenant le promoteur phzA1 ainsi que site attP''B par lequel s'est faite l'insertion du mini-CTX dans le chromosome de PA14. L'amplicon obtenu est de 1,4 kpb (700pb du promoteur phzA1, et 700 pb de la région codant pour le site FRT après excision du reste du vecteur et pour le site attP''B).

3.2.11.6 Construction des souches PA14 ::phzA1-lux et pqsE-::phzA1-lux

3.2.11.6.1 Insertion du mini-CTX-phzA1-lux dans le chromosome de PA14 et de pqsE

Le vecteur pCDS101 est électroporé dans *E. coli* χ7213 en présence de DAP, puis transféré par conjugaison dans les souches PA14 et *pqsE*. La conjugaison est réalisée selon la méthode décrite au chapitre précédent (voir section 2.2.10, p. 72). La sélection des transconjugants se fait en présence de 75 mg/l de tétracycline et en absence de DAP pour éliminer *E. coli*. Les colonies sélectionnées sont donc résistantes à la tétracycline et expriment les gènes *lux*, soit de manière importante pour les souches PA14 mini-CTX-*phzA1-lux*, soit très faiblement pour les souches *pqsE* mini-CTX-*phzA1-lux*. La méthode de discrimination a été validée lors d'un mélange entre les deux souches.

Les deux souches obtenues ont été rendues sensibles à la tétracycline selon le protocole présenté au point 3.2.11.5.2 p. 195 au moyen du vecteur pFLP2 codant pour une flipase. Les colonies sélectionnées sont celles qui ont perdu leur résistance à la tétracycline (perte du reste du vecteur mini-CTX), à la carbénicilline (élimination du vecteur pFLP2 en présence de 10% de sucrose en milieu LB sans NaCl) et plus (pour sélectionner les souches PA14 phzA1-lux) ou moins (pour sélectionner les souches pqsE phzA1-lux) luminescentes.

3.2.12 Mutagenèses aléatoires et criblages

3.2.12.1 Criblage au moyen du rapporteur phzA1-lacZ

Une conjugaison entre la souche *pqsE phzA1-lacZ* et une souche d'*E. coli* contenant le plasmide pMC639 (IS*phoA/hah* (Jacobs *et al.*, 2003)) est réalisée dans des conditions identiques à celles présentées au chapitre 2 (voir section 2.2.10, p. 72). La conjugaison est aliquotée par échantillon de 250 µl et conservée à -80°C.

Les conditions de culture ont été optimisées pour maximiser le contraste bleu/blanc entre ces deux souches. Différents paramètres ont été testés : la concentration de X-gal dans la gélose (10 à 40 mg/l), la température d'incubation (25 à 42°C), le temps d'incubation, la présence de X-gal dans l'agar ou en surface seulement, l'utilisation de l'alizarine-gal en remplacement du X-gal (James *et al.*, 2000), l'utilisation d'EPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) pour diminuer la transcription basale de la beta-galactosidase (Ritz *et al.*, 2000), les milieux King A, King B, TSB et M9.

Pour confirmer la bonne interprétation des résultats, un ratio de 1 bactérie de PA14 phzA1-lacZ pour 99 bactéries pqsE phzA1-lacZ a été incubé sur gélose solide. L'identification des souches PA14 fut confirmée en cultivant les colonies sélectionnées et en observant la production de pyocyanine en culture liquide.

Au final, le criblage a été effectué sur de grandes géloses carrées contenant 200 ml LB agar avec 75 mg/l tétracycline, 25 mg/l triclosan, 15 mg/l chloramphénicol et 40 mg/l X-gal. Un aliquot de 250 µl a été dilué dans 1750 µl de milieu TSB liquide et a été ensemencé sur une plaque de gélose pour obtenir environ 1000 colonies par plaque. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 36 heures puis stockées à 4°C pour une quinzaine d'heures. Les colonies les plus bleues ont été sélectionnées puis vérifiées par analyse de l'activité beta-galactosidase en milieu liquide (voir section 3.2.2 p186) (Miller, 1972), puis le site d'insertion du transposon a été déterminé au besoin par séquençage (voir section 2.2.11 du chapitre 2).

3.2.12.2 Criblage au moyen du rapporteur phzA1-lux

La conjugaison est réalisée entre les souches de *P. aeruginosa* décrites au point précédent et la souche d'*E. coli* χ7213 porteuse du vecteur pIT2 selon les méthodes habituelles (voir section 2.2.10, p. 72). La biomasse est resuspendue dans 4 ml de milieu

LB contenant 15% de glycérol. Des aliquots de 150 µl sont conservés à -80°C. Chaque aliquot est dilué dans 15 ml de TSB, et 2 ml de cette dilution sont étalés sur chaque gélose de 20 x 20 cm pour obtenir environ 700 colonies par plaque. Les plaques sont incubées durant 30 heures à 37°C puis durant une quinzaine d'heures à température ambiante. Le criblage a été réalisé par la stagiaire Natacha Saint-Laurent sur environ 400 000 colonies (environ 550 plaques). Les colonies présentant une plus forte luminosité sont cultivées en milieu liquide afin d'observer la production éventuelle de pyocyanine.

3.2.13 2D-PAGE

3.2.13.1 Fractionnement des ARN en fonction de leur taille

Le protocole publié par Hokii et ses collègues(Hokii et al., 2006) a été utilisé pour séparer les ARN en 3 fractions (33%, 41% et 44% isopropanol contenant les ARN supérieurs à 500 nt, entre 500 et 100 nt et inférieurs à 100 nt, respectivement). Le culot d'ARN obtenu est dissous dans 30 µl d'eau DEPC pour chacune des fractions.

3.2.13.2 Gel de polyacrylamide d'électrophorèse à deux dimensions

Les gels de polyacrylamide utilisés pour le 2D-PAGE ont une teneur de 12% d'acrylamide pour la première dimension et de 15% pour la seconde. Le tampon de migration est le TBE 0,3X. La migration s'est réalisée sous un voltage de 70 V pendant deux heures puis à 100 V durant une quinzaine d'heures à 4°C. Les échantillons migrent une première fois en conditions natives. La bande de migration est découpée et placée horizontalement sur le gel de la seconde dimension. La séparation sur la seconde dimension se fait en conditions dénaturantes en présence de 50% d'urée, avec un voltage de 90 V pendant deux heures puis de 150 V. L'échantillon chargé sur le gel est composé de 4 µl de solution d'ARN, 4 µl d'eau DEPC et 4 µl de tampon de charge. L'ARN présent dans le gel est révélé au SYBRgold (BioRad) durant 40 min.

Par la suite, la seconde dimension a été éliminée, et la première a été optimisée. Plusieurs paramètres ont été étudiés (12% jusque 22% de polyacrylamide avec essais de gradients de concentration, en conditions dénaturantes ou non, variation de la quantité d'ARN chargée sur le gel). Les conditions optimales sont atteintes avec 22% de

polyacrylamide et 50% d'urée. La quantité d'ARN n'influence pas la qualité de migration et de séparation.

3.2.14 Dot blot

Les échantillons d'ADN à fixer sur la membrane sont préparés dans du TRIS-HCl 10 mM EDTA, 1 mM pH 8,0. L'ADN est obtenu à partir d'amplification PCR de la séquence à détecter, ou à partir d'ADN complémentaire. L'échantillon d'ADN est chauffé puis rapidement refroidi afin de séparer les doubles brins (dans le cas du produit PCR). Deux µl de la solution sont déposés sur une membrane de nylon (Roche). L'ADN est fixé sur la membrane au transilluminateur UV (GS Gene Linker, Bio-Rad). La membrane est ensuite lavée deux fois dans une solution de SSPE (150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM EDTA, pH7,4) 0,5X et SDS 0,1%, puis séchée.

Pour l'hybridation, la membrane est préalablement incubée dans une solution de préhybridation (SSPE 5X, solution de blocage 1% (Blocking Solution 11 096 176 001 de Roche), *N*-Lauryl sarcosine 0,1%, SDS 0,02%), puis mouillée dans une solution de SSPE 5X durant 3 h.

Trente min. avant la fin de l'incubation, 200-500 ng de sonde (produit PCR de rsmZ, marqué à la digoxygénine selon le protocole de Roche (DIG Luminescent Detection Kit)) sont dilués pour un ratio de 1:1 avec un tampon de dilution (Roche, 11 175 041 910), bouillis 10 min. et mélangés dans 10 ml de solution de pré-hybridation. La membrane est alors transférée dans cette solution d'hybridation et incubée à 58°C pendant 24 h.

Après l'hybridation, la membrane est lavée avec du SDS 0,1% et des concentrations décroissantes de SSPE (5X, 1X, 0,5X), pendant 30 min. Elle est ensuite révélée au NBT/BCIP selon le protocole de Roche (11 745 832 910).

3.2.15 SCOTS

Le SCOTS (Selective Capture Of Transcribed Sequences) est une méthode d'hybridation soustractive permettant de comparer l'expression des gènes dans deux conditions expérimentales différentes (Graham & Clark-Curtiss, 1999). Ici, il est utilisé pour identifier les ARN présents uniquement en absence de PqsE, c'est-à-dire présents

chez le mutant *pqsE* et absents chez la souche sauvage PA14. Parmi ces ARN, ceux dont la séquence se situe sur des régions intergéniques, et qui sont donc non codants, seront étudiés en priorité. La Figure 3-11 représente la méthode SCOTS.

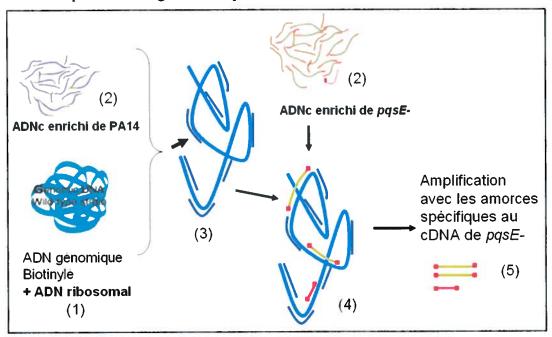


Figure 3-11. Schématisation globale de la méthode SCOTS.

(1) L'ADN génomique de PA14 est biotinylé, et hybridé avec un excès d'ADN ribosomal afin d'empêcher la future hybridation d'ADNc ribosomal présent en excès. (2) L'ARN des deux conditions expérimentales étudiées (dans ce cas, l'ARN de la souche sauvage PA14 et du mutant pqsE) est extrait, transcrit en ADNc puis hybridé sur l'ADN génomique et ribosomal biotinylé afin d'enrichir les ARN moins abondants.

L'ADNc qui s'est hybridé est récupéré et est enrichi par PCR (3) L'ADNc enrichi de PA14 est à nouveau

L'ADNc qui s'est hybridé est récupéré et est enrichi par PCR (3) L'ADNc enrichi de PA14 est à nouveau hybridé sur l'ADN génomique et ribosomal biotinylé. (4) L'ADNc enrichi de pqsE est ajouté par la suite, et viendra s'hybrider sur les séquences qui ne sont pas représentées dans l'ADNc de PA14. (5) Celles-ci sont récupérées et enrichies par PCR, puis séquencées afin d'être identifiées.

3.2.15.1 Isolement des acides nucléiques (étapes 1 et 2)

3.2.15.1.1 Extraction d'ADN génomique (étape 1)

L'ADN génomique de PA14 est nécessaire pour enrichir l'ADNc des deux souches à comparer (étape (2) de la Figure 3-11) et pour permettre l'hybridation soustractive (étapes (3) et (4) de la Figure 3-11). Le protocole d'extraction est présenté au point 3.2.11.2 p. 192. L'ADN génomique obtenu est aliquoté par 10 µl à une concentration de 300 ng/µl, concentration requise pour les étapes d'hybridation avec l'ADNc. Environ 3-4 µg d'ADN génomique sont requis pour la totalité de la méthode, c'est-à-dire 10 aliquots.

3.2.15.1.2 Préparation de l'ADN ribosomal (étape 1)

L'ADN ribosomal sert à « bloquer » les séquences d'ADN ribosomal sur l'ADN génomique de PA14. Cette étape est nécessaire, car plus de 82% de l'ARN récupéré est d'origine ribosomale (Neidhardt & Umbarger, 1996). *P. aeruginosa* possède cinq opérons codant pour des ARN ribosomaux (www.Pseudomonas.com). Ceux-ci sont amplifiés par PCR (positions 733095 à 738251, 4952020 à 4957169, 5536028 à 5541183 et 63112498 à 63117654 sur le génome de PA14) au moyen des amorces VDriboR et VDriboF (voir Appendice C). Les amplicons sont clonés dans le vecteur pGEM-t-easy (Fisher) et le produit de ligation est transformé dans *E. coli* DH5α pour y être répliqué. Une extraction plasmidique est réalisée sur les colonies résistantes à l'ampicilline (100 mg/l) et de couleur blanche en présence de X-gal (40 mg/l). La présence des inserts est confirmée par digestion enzymatique. Environ 150 μg d'ADN ribosomal sont nécessaires pour l'ensemble de la méthode. L'ADN ribosomal est stocké à une concentration de 1,5 μg/μl.

3.2.15.1.3 Production d'ADN complémentaire (étape 2)

3.2.15.1.3.1 Extraction de l'ARN

Le protocole d'extraction de l'ARN est présenté au point 3.2.11.3 p192. L'extraction se fait en cinq réplicats, pour chacune des deux conditions suivies.

3.2.15.1.3.2 Transcription inverse: production d'ADN complémentaire

Environ 1 μg d'ARN est incubé avec 200 ng d'amorce aléatoire (VDaleatoireN pour générer l'ADNc de *pqsE* et VDaleatoirePA14 pour générer celui de PA14 (voir Appendice C) et 200 unités de la transcriptase inverse Superscript II selon le protocole proposé par Invitrogen (Cat. 18064-022). Les amorces utilisées pour la transcription inverse possèdent une étiquette spécifique à chaque condition (une étiquette différente pour l'ADNc de *pqsE* et de PA14), nécessaire pour amplifier l'ADN complémentaire par la suite. La synthèse du second brin se fait en présence de 10 mM de dNTP, le tampon Klenow (New England Biolabs) et 5 unités de Klenow (NEB, produit M0210L), durant 30 min. à 37°C.

3.2.15.1.3.3 Enrichissement de l'ADNc par PCR

L'ADN complémentaire obtenu est amplifié par PCR. Les amorces utilisées possèdent la séquence complémentaire à celle codée sur les étiquettes des amorces pour la transcription inverse. Dans le cas du SCOTS, l'ADNc de *pqsE* est amplifié au moyen des amorces VDscotsN, tandis que celui de PA14 nécessite les amorces VDscotsPA14 (voir Appendice C). Le produit est précipité à l'éthanol en présence de glycogène puis resuspendu dans 12 µl de tampon d'hybridation (SSPE 5X, *N*-lauryl sarcosine 0,1%, SDS 0,02%). L'ADN complémentaire purifié est alors quantifié au spectrophotomètre, puis dilué pour obtenir une concentration de 125 ng/µl. Des aliquots de 4 µl (500 ng) sont alors stockés à -80°C. Cinq aliquots, soit 2,5 µg ADNc, sont nécessaires par condition expérimentale.

3.2.15.2 Biotinylation de l'ADN génomique (étape 1)

L'ADN génomique de PA14 doit être biotinylé afin de récupérer les séquences qui s'hybrideront sur celui-ci lors des étapes d'enrichissement des ADNc et d'hybridation soustractive (étapes (2), (3) et (4) de la Figure 3-11). La méthode est décrite en détail (Daigle *et al.*, 2002). En bref, de l'acétate de photobiotine (Sigma A1935) est incubé avec l'ADN génomique. La biotine est activée à la lumière en exposant le tube à une source lumineuse de 200W durant deux fois 30 min. Exactement 3 µg d'ADN génomique (un aliquot de 10 µl à 300 ng/µl) doit être biotinylé pour chaque condition expérimentale. La biotine non fixée est éliminée par quatre extractions à l'isobutanol saturé en eau.

3.2.15.3 Hybridation de l'ADN ribosomal avec l'ADN génomique (étape 1)

L'ADN ribosomal est ajouté à l'ADN génomique biotinylé (Daigle et al., 2002) à raison de 50 µg pour 3 µg d'ADN génomique. La solution est ajustée à 500 µl avec de l'eau stérile. Elle est ensuite soniquée à une amplitude de 30% durant 30 sec. au moyen du sonicateur (Sonics and Materials, Vibra Cell) pour obtenir des fragments de 1 à 5 kb. L'échantillon est finalement aliquoté en 10 tubes égaux de 0,3 µg d'ADN génomique biotinylé et 5 µg d'ADN ribosomal. Ceux-ci sont précipités à l'éthanol et conservés à -80°C. Lors de leur utilisation, ils sont redissous chacun dans 4 µl de tampon d'hybridation (voir point 3.2.15.1.3.3 p. 202).

3.2.15.4 Hybridation, normalisation et capture des ADNc (étape 3)

Cette étape sert à diminuer la très forte proportion d'ADNc ribosomal présent dans l'échantillon d'ADN complémentaire et à augmenter la proportion de séquences à plus faible nombre de copies.

Pour diminuer la proportion d'ADNc ribosomal par rapport au reste de l'ADNc, les régions de l'ADN génomique codant pour l'ARN ribosomal doivent être « bloquées », c'est-à-dire hybridées au préalable avec de l'ADN ribosomal. Ainsi, lorsque l'ADNc sera incubé avec l'ADN génomique, l'ADNc issu de l'ARN ribosomal ne pourra plus s'hybrider avec lui et ne sera donc pas capturé.

L'échantillon contenant l'ADN génomique et ribosomal est bouilli pendant 3 min., ajusté avec du NaCl pour obtenir une concentration finale de 0,2 M et incubé à 67°C durant 30 min. Les échantillons d'ADNc de PA14 et de *pqsE* subissent les mêmes conditions afin de favoriser l'auto-hybridation entre les ADNc abondants. Chaque échantillon d'ADNc est mélangé avec un échantillon d'ADN génomique et ribosomal, et incubé à 67°C durant 18 à 24 h pour permettre l'hybridation ADNc-ADN génomique. Il est ajusté ensuite avec de l'eau pour un obtenir volume de 500 µl.

Toutes les séquences qui se sont hybridées sur l'ADN génomique biotinylé sont capturées en présence de billes de streptavidine (Dynabeads M-280, Dynal, Lake Success, NY) selon le protocole du fournisseur. Les billes sont lavées trois fois puis resuspendues dans 500 µl de tampon de lavage et de liaison (10 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) 2X.

L'ADN hybridé et les billes de streptavidine sont mélangés et incubés durant 10 min. à 37°C en agitant fréquemment. L'ADN complexé aux billes est récupéré par magnétisme. Le culot de billes et d'ADN est lavé trois fois 15 min. en présence du tampon de lavage (acide malique 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, 0,3% Tween 20). L'ADN est ensuite élué en présence de 100 µl NaOH 0,4 N durant 10 min. à 37°C. L'ADN obtenu est précipité à l'éthanol (voir section 3.2.11.3.2 p. 193) et dissous dans 40 µl de tampon TE. L'ADNc récupéré est spécifiquement amplifié au moyen des amorces VDscotsN et VDscotsPA14 pour l'ADNc de pqsE et de PA14, respectivement, en présence d'1 µl d'ADN dans une réaction de 10 µl. L'hybridation se fait ainsi pour les 5 échantillons d'ADNc de pqsE et de PA14, soit 10 hybridations parallèles. Elles sont

ensuite regroupées. Un minimum de 20 µl est conservé à -80°C, tandis que le reste est précipité à l'éthanol, resuspendu dans 6 µl de tampon d'hybridation, quantifié au spectrophotomètre et dilué pour obtenir une concentration de 125 ng/µl. Pour la seconde ronde d'hybridation, 500 ng sont utilisés. Trois rondes sont ainsi effectuées pour l'ADNc de chacune des deux souches.

3.2.15.5 Enrichissement : sélection des ADNc présents uniquement chez la souche pqsE (étape 4).

Cette étape sert à hybrider l'ADNc enrichi de pqsE sur l'ADN génomique, « bloqué » au préalable par l'ADN ribosomal mais également par l'ADNc de PA14. Cette étape permet d'identifier les ADNc exprimés uniquement dans pqsE. L'hybridation se déroule de manière similaire à précédemment (voir section 3.2.15.4 p. 203), mais l'ADNc de PA14 obtenu après les trois rondes SCOTS est ajouté dans le tube contentant l'ADN génomique et ribosomal. Trois rondes consécutives sont ainsi réalisées afin d'enrichir les ADNc spécifiques à pqsE. Les fragments obtenus sont alors séquencés par Génome Québec afin d'en connaître l'identité.

3.3 Résultats

Pour rappel, l'objectif majeur de ce projet est d'identifier la fonction de PqsE. La méthode privilégiée est l'identification du substrat naturel de PqsE. Dans ce but, trois objectifs spécifiques doivent être réalisés : (i) la caractérisation de l'activité enzymatique de PqsE, (ii) l'approfondissement des phénotypes qu'il influence et (iii) l'identification proprement dite de son substrat. Le premier point de la section résultat est donc dédié à l'étude de la structure primaire et secondaire de PqsE ainsi qu'à l'identification de la famille enzymatique à laquelle elle pourrait appartenir.

3.3.1 PqsE et les métallo-beta-lactamases

3.3.1.1 Homologies de séquence protéique avec PqsE

Grâce au séquençage complet de plusieurs souches de *P. aeruginosa*, dont en premier la souche PAO1 réalisé en 2000 (Stover *et al.*, 2000), les séquences nucléotidique et peptidique de PqsE sont accessibles (www.pseudomonas.com). Elles ont

été utilisées dans le but d'orienter mes recherches sur la fonction de PqsE en comparant sa séquence avec les banques de séquences protéiques disponibles.

Le gène pqsE est situé en dernière position au sein d'un opéron polycistronique de 5 gènes. Il est composé de 905 paires de bases, générant une protéine hypothétique de 301 acides aminés. La séquence peptidique de PqsE a été soumise à une recherche d'homologie dans les banques de données et plusieurs similarités ont pu être mises en évidence (Figure 3-12).

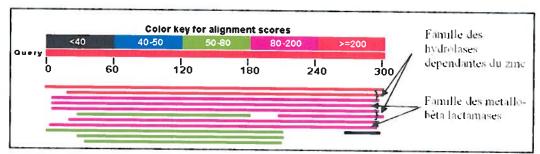


Figure 3-12. Alignement protéine-protéine de la séquence de PqsE par BLAST protéine-protéine (blastp) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

La protéine hypothétique PqsE possède 94,2% d'alignement avec la séquence consensus du domaine conservé pfam00753 caractéristique des β-lactamases de classe B ou métallo-β-lactamases (Finn *et al.*, 2010). Les métallo-β-lactamases font partie de la famille des β-lactamases, elle-même incluse dans la famille des hydrolases dépendantes du zinc. Ce domaine pfam00753 s'étend du 13° au 221° acide aminé (190 résidus) de la protéine. Sur ces 190 résidus, près de 178 se retrouvent donc chez PqsE.

Dans cette même région, PqsE présente 68,7% d'alignement avec la séquence consensus d'un autre domaine, le domaine COG0491 fortement conservé chez certaines hydrolases dépendantes du zinc, et s'étendant sur près de 252 acides aminés (Tatusov *et al.*, 2000). PqsE possède donc près de 173 acides aminés en commun avec la séquence consensus de ce domaine.

3.3.1.2 PqsE possède des homologues chez le genre bactérien Burkholderia

Les résultats obtenus par BLAST nous apprennent que, outre les domaines conservés qu'elle possède, PqsE présente un bonne homologie avec une métallo-β-

lactamase hypothétique retrouvée chez de nombreuses souches des espèces *Burkholderia* pseudomallei (31% d'identité, 47% d'homologie), *B. thailandensis* (31% d'identité, 50% d'homologie) et *B. ambifaria* (32% d'identité, 47% d'homologie).

Un alignement de séquences a été réalisé avec PqsE de *P. aeruginosa* et les protéines qui lui sont homologues dans *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* et *B. ambifaria* afin d'en localiser les régions conservées au moyen du logiciel ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/). Bien que la protéine PqsE de *P. aeruginosa* soit celle qui se différencie le plus parmi les quatre séquences, on peut remarquer que les résidus d'acides aminés les plus conservés chez les différentes espèces se situent principalement dans les motifs caractéristiques des hydrolases dépendantes du zinc, dont les résidus essentiels à leur fonction sont encadrés dans la Figure 3-13, appuyant ainsi l'hypothèse que PqsE appartient à ce groupe d'enzymes.

burkP.	MQHGTPGRIDSRLAIVGTADVPLYVIVN-DEAATLVEGGLSGMTELVW 47
burkT.	MRALSKLKEPNDMQHGTPGRIDSRLAIVGTADVPLYVIVN-DEAATLVEGGLSGNTELVW 59
burka-	-MGLCALSELNDMLNASPGWIDQRLALYGTADVPLYVIVN-DEAATLIEGGLSGMTELVW 58
pasE	MLRLSAPGQLDDDLCLLGDVQVPVFLLRLGEASWALVEGGISRDAELVW 49
	: ** * * * * * * * * * * * * * * * *
burkP.	ROLHE LLSDY GGIRHLRYMLITHSHYDHCSILGTLAPRMPULHIVGSAATADAL OSPSAC 10
burkT.	RQLHE LLSDF GGIRHLRYWLITHSHYDHCSLLGTLAPRMP WLHIVGSAATADALQSPSAC 11:
burkA.	QQLHD LR-DFGGIRHLRYWLITHSHYDHCSLLMTLKSRMPULHVSGSPDAFDAFQSPSAC 11
pgsE	ADLCRUVADP SQVHYMLITHKHYDHCGLLPYLCPRLP NVQVLASERTCQAWKSESAV 10
******	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
burkP.	PTTPAINAGACAME PUARA ARI COLDI VIN COCA DE COMPANIO
burkT.	RTIRALDAQACAAWEPVAAA AELSDIPLYPLNPGRSLDIGEGMRMRALALPCHSACLL 16
burkA.	RTIRALDAQACAAWEPYAAA AELSDIPLYPLNPGRSLDIGEGMRMRALALPGHSACLL 17
pgsE	RTIRQLDAQASRSUD PAVGVDFTELSDLPFYPVNPDTQLD IGDGMQIRTIALPGHSRCQF 17
#ax#	RVVERLNRQLLRAEQRLPEA CAWDALPVRAVADGEWLE LGPRHRLQVIERHCHSDDHV 16
	*.:. *: * :::: . *::* :::: ***
burkP.	CWIGDOWN
hurkT.	GYHCPQLDLLFVSDALGEYHAPT-QWLPLVFQDLAAYRLSLDAIERQ-HASRIALGHGI 223
burkA.	GIRCPULLEVENALUEYHAPT-QWLPLVFODLAAYRLSLDATERO-HASDTALIGHGT 221
*******	GYYCPQLDIGEVANALGEFQGAT-SWLPLVFODLFAYRHTIDVTFOL-0 Appr 31 dubg 7 220
pasE	V FIDVRRRRLFCEDJALGEFDEAEGVWRPLV FDDMEAYLES LERLORLPTLLOLIPHIGG. 224
	:: : * - * * * * * * * * * * * : * : : : :
burk?	VGGGI ARHAVRHARD GLAARDDEARAARGD ANATRALARQUTERYAARS ANVVPRALHLK 283
burkT-	V GGGL ARMAY KHARD GLAARDDEAR AARGD ANATR ALARO HITERY AAD GARDYDD ATHT KE SOE
burka.	LTGELARSAVRHARTCLDAREADARAVRGNATATHELAHQUTARYAARSERVVPHFLHLK 295
pase	LRGRL AADGAESAYTECLRLCRRLLWRQSMGESLDELSEE LHRAWGGQSVDFLPGELHLG 284
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

burkP.	SMERNIDLFQRAA 296
burkT.	SMERM IDLFQRAA 308
burkA.	SMMHNIDLFHRAE 308
pgsE	SMRRMLEILSRQALPLD 301
	** : *:::: *

Figure 3-13. Alignement de séquences entre PqsE et les gènes retrouvés dans les espèces *Burkholderia* ayant le plus d'homologie avec PqsE (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

burkP. = B. pseudomallei; burkT. =B. thailandensis; burkA. = B. ambifaria. En gras : motifs conservés dans la superfamille des hydrolases dépendantes du zinc selon Daiyasu et al. (Daiyasu et al., 2001). Encadré : résidus essentiels pour la liaison avec le métal (zinc ou fer principalement) (Daiyasu et al., 2001). Étoiles blanches sur fond noir : résidus d'acides aminés qui pourraient avoir un rôle dans l'activité enzymatique de PqsE (car ils contiennent les résidus nécessaires à la fixation du métal, ils sont situés dans les segments conservés typiques des hydrolases dépendantes du zinc et ils sont conservés dans les quatre séquences alignées ci-dessus).

3.3.1.3 PqsE n'est pas une beta-lactamase

Pour vérifier l'appartenance de PqsE à l'une des sous-familles des hydrolases dépendantes du zinc, plusieurs tests ont été réalisés. Il est aisé de déterminer si la fonction de PqsE est liée à l'hydrolyse des noyaux beta-lactame. Si tel est le cas, *P. aeruginosa* devrait présenter une résistance aux antibiotiques de la classe des beta-lactames supérieure à celle d'un mutant *pqsE*. Des tests en milieu solide ont été réalisés en

présence de différentes concentrations de carbénicilline et d'ampicilline, deux betalactames, mais aucune différence de sensibilité n'a été observée entre le mutant pqsE et la souche sauvage PA14. Ceci suggère que PqsE ne confère pas de résistance à cette classe d'antibiotiques.

Le captopril est un inhibiteur de plusieurs zinc-métalloprotéases. Il est utilisé en médecine entre autres pour empêcher la production d'angiotensine et diminuer l'hypertension artérielle (Baudin, 2002), et certains chercheurs ont testé son efficacité pour inhiber les zinc-métalloprotéases impliquées dans la synthèse des toxines liées au botulisme et au tétanos (de Paiva et al., 1993). PqsE pourrait-il avoir des homologies avec les cibles du captopril ? La souche sauvage PA14 a été cultivée en présence de différentes concentrations de cet inhibiteur (3 à 7,5 mM), et la production de pyocyanine, témoignant de l'activité de PqsE, a été quantifiée. À la concentration à laquelle la croissance n'est pas affectée, c'est-à-dire à 3 mM, aucune différence n'a été mise en évidence dans cette souche en présence de captopril (Figure 3-14).

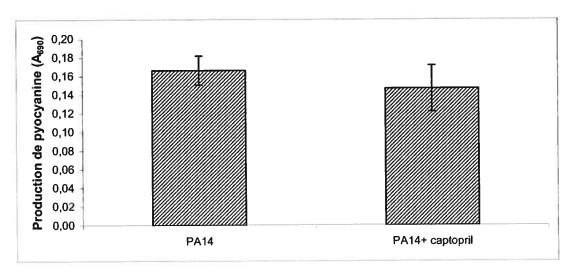


Figure 3-14. Production de pyocyanine en présence de 3 mM captopril dans PA14.

3.3.1.4 PqsE n'est pas une glyoxalase II

Le méthylglyoxal est un produit de la glycolyse (via le phosphate dihydroxyacétone), du métabolisme des acides gras (via l'acétone) et de celui des protéines (via l'aminoacétone). Il fait également partie des constituants bactéricides contenus dans le miel d'abeille (Kwakman et al., 2010). Ce composé est fortement toxique, probablement dû à son interaction avec les protéines (Kalapos, 1999). Il existe plusieurs voies enzymatiques capables de dégrader le méthylglyoxal. La voie la plus commune dépend des enzymes glyoxalases. Les glyoxalases I convertissent le méthylglyoxal en S-lactoyl glutathione en présence de glutathione. Le S-lactoyl glutathione possède également des effets cytotoxiques en inhibant la synthèse d'ADN (Thornalley, 1993). Les glyoxalases II sont responsables de le transformer en D-lactate (Sukdeo & Honek, 2008). Elles font partie de la superfamille des métallo-beta-lactamases (Daiyasu et al., 2001). Afin de vérifier si PqsE possède une fonction de glyoxalase, j'ai comparé la sensibilité du mutant pqsE avec celle de la souche sauvage en présence de méthylglyoxal. En présence de 0,5 mM de méthylglyoxal, j'ai observé une diminution de la croissance similaire dans les deux conditions, ce qui montre que PqsE ne détoxifie pas le méthylglyoxal.

3.3.1.5 PqsE n'est pas une aryl-sulfatase

Robetta est un logiciel de prédiction de structure protéique (http://robetta.bakerlab.org/). Il combine des méthodes de prédiction de structure à partir des domaines conservés de la protéine d'intérêt avec des méthodes de prédiction basées sur la structure de protéines homologues (Chivian *et al.*, 2003). La séquence protéique de PqsE a été soumise à ce logiciel, et l'homologie de structure la plus importante s'est faite avec SdsA1, une aryl-sulfatase nécessaire pour utiliser les sulfates primaires tels que le SDS comme source de carbone ou de soufre (Hagelueken *et al.*, 2006).

Les aryl-sulfatases sont inhibées par l'acide 1-décane sulfonique (1-DSASS). Différentes concentrations de cet inhibiteur allant de 50 à 450 µM ont été données à la souche sauvage PA14 afin de vérifier si celui-ci bloquait PqsE et générait un phénotype semblable à celui de ce mutant. La production de pyocyanine a permis de suivre

indirectement l'inhibition éventuelle de PqsE. Celle-ci n'a été affectée avec aucune des concentrations de 1-DSASS testées, ce qui suggère que PqsE n'est pas une aryl-sulfatase.

3.3.1.6 Homologies avec les RNases

Le logiciel BLOCKS (http://blocks.fhcrc.org/) est un logiciel qui permet de comparer une séquence protéique à une base de données de « blocs » protéiques, c'est-à-dire de régions ou de domaines hautement conservés retrouvés dans les protéines. La séquence de PqsE a été soumise à ce logiciel. Une forte homologie a été détectée avec l'un des 3 « blocs » protéiques conservés dans la famille des métallo-beta-lactamases métabolisant l'ARN (Figure 3-15). La troisième meilleure homologie se fait également avec une enzyme dont le substrat est nucléotidique.

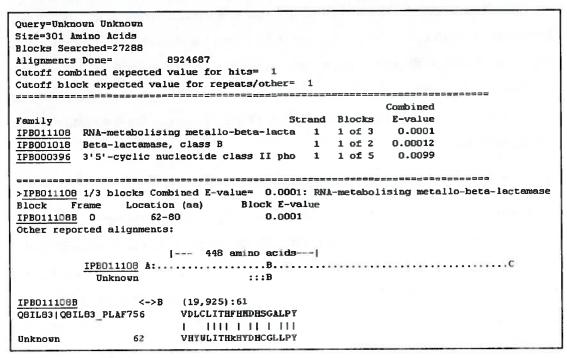


Figure 3-15. Alignement de séquence des domaines conservés de PqsE et d'une métallo-betalactamase impliquée dans le métabolisme de l'ARN (http://blocks.fhcrc.org/).

Le bloc protéique présentant beaucoup de similarité avec PqsE se situe dans le domaine HxHxDH de PqsE typique de toutes les hydrolases. Bien que ces 4 résidus conservés fassent partie des homologies observées, ce sont surtout les résidus un peu en amont et juste en aval de ce domaine qui présentent le plus d'identité avec PqsE.

3.3.1.7 Le substrat naturel de PqsE ne serait pas une molécule extracellulaire

La plupart des protéines de la famille des métallo-beta-lactamases agissent sur de petites molécules hydrolysables. Dans l'hypothèse où le substrat ou le produit de PqsE est une petite molécule extracellulaire, il devrait être possible de complémenter un mutant pqsE lors d'une co-culture avec P. aeruginosa. Pour vérifier s'il y a complémentation ou non, il me faut suivre un paramètre totalement dépendant de PqsE et de sa fonction, et vérifier si celui-ci peut être induit chez le mutant pqsE. La production de pyocyanine étant totalement dépendante de PqsE, ce sera elle qui sera suivie. La co-culture doit se faire avec un mutant ne produisant pas de pyocyanine (mais dans lequel le processus de régulation de cette dernière reste intact) afin de garantir que toute pyocyanine observée soit produite par le mutant pqsE. Le mutant $phzCI^-C2^-$, ne produisant aucune phénazine (Figure 3-1 p.161), a donc été sélectionné pour l'expérience.

La production de la pyocyanine a été suivie dans une co-culture contenant le double mutant $phzCI^-C2^-$ et le mutant $pqsE^-$. Ces deux mutants, lorsqu'ils sont étudiés en culture pure, sont incapables de produire de la pyocyanine. Lorsqu'ils sont cultivés ensemble, le mutant $pqsE^-$ devrait être exposé au substrat hypothétique de PqsE, et si ce dernier est extracellulaire, il pourra être transformé par la protéine PqsE présente dans le double mutant $phzCI^-C2^-$. Ce nouveau produit pourra ensuite être récupéré par le mutant $pqsE^-$, qui pourra alors produire la pyocyanine en activant les gènes phzA1B1C1D1E1F1G1 et phzA2B2C2D2E2F2G2 chez ce dernier.

La co-culture entre pqsE et phzC1 C2 n'a jamais produit de pyocyanine (Figure 3-16), ce qui suggère que le substrat de PqsE n'est pas une molécule extracellulaire.

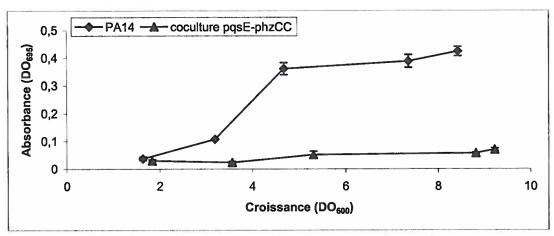


Figure 3-16. Production de pyocyanine dans une co-culture des mutants phzCI CZ et pqsE.

Au terme de cette première section de résultats, il s'avère que la protéine PqsE appartient à la famille des hydrolases dépendantes du zinc. Toutefois, elle ne partage de propriétés enzymatiques avec aucune sous-famille testée ici, telles que les β-lactamases, les aryl-sulfatases ou les glyoxalases de type II. Plus complexe encore, bien que les hydrolases agissent sur des substrats généralement petits et diffusables, et donc extracellulaires, les résultats présentés ici suggèrent que le substrat de PqsE pourrait être intracellulaire. Ceci est appuyé par le fait qu'aucune complémentation n'a été réalisée chez le mutant *pqsE* en co-culture. Il faudrait donc approfondir les connaissances sur le rôle de PqsE dans le métabolisme cellulaire afin de faciliter la caractérisation de son activité enzymatique et de son substrat.

3.3.2 Paramètres phénotypiques dépendant de la présence ou de l'absence de PqsE

Afin de comprendre le rôle de PqsE, il faut identifier les paramètres qu'il contrôle, et l'effet de sa présence chez *P. aeruginosa*. Tel que présenté dans la section d'introduction de ce chapitre, un mutant *pqsE* présente trois phénotypes fort marqués : (i) la diminution de nombreux gènes de défense contre le stress oxydatif, (ii) la diminution de l'expression de nombreux gènes et de facteurs de virulence contrôlés par le QS, et plus particulièrement (iii) l'absence de production de la pyocyanine. Quel est le lien unissant ces trois phénotypes ? L'un pourrait-il induire l'apparition d'un autre ? Sont-ils des cibles

directes ou indirectes de PqsE ? La section prochaine regroupe les expériences qui ont été nécessaires pour répondre à ces questions.

3.3.2.1 La diminution du stress oxydatif est liée à l'absence de pyocyanine chez le mutant pqsE⁻

3.3.2.1.1 La diminution de transcription des gènes liés au stress oxydatif est due à l'absence de stress et non à une répression spécifique de ces gènes

Puisque les gènes de résistance au stress oxydatif sont peu transcrits chez le mutant pqsE, cela signifie-t-il que ce mutant est moins armé pour faire face à ce stress, et y serait donc plus sensible ? Pour le vérifier, les résistances du mutant pqsE et de la souche sauvage PA14 au paraquat ou au peroxyde d'hydrogène ont été comparées. La résistance présentée par les deux souches est très semblable (Figure 3-17). Cela signifie que les gènes de résistance au stress oxydatif ne sont pas réprimés en absence de PqsE mais seulement sous-exprimés. PqsE n'interviendrait donc pas directement sur la transcription des gènes de résistance au stress oxydatif, mais induirait indirectement un stress oxydatif qui activerait celle-ci.



Figure 3-17. Test de résistance au stress oxydatif chez PA14 et chez le mutant pqsE. Disque imbibé de paraquat 1mM (P) ou de peroxyde d'hydrogène 3% (H) sur un tapis bactérien de PA14 ou du mutant pqsE.

3.3.2.1.2 La pyocyanine complémente partiellement un mutant pqsE

Une hypothèse proposée est que PqsE influence la production de pyocyanine, qui elle-même induit les autres effets attribués à PqsE. Ceci est appuyé par le fait que la pyocyanine génère un stress oxydatif (Hassett et al., 1992) et qu'elle pourrait également agir comme molécule-signal (Dietrich et al., 2006). Pour vérifier cette hypothèse, de la pyocyanine a été ajoutée dans une culture du mutant pqsE, afin de déterminer si celle-ci complémentait la mutation. La transcription des gènes phzA1-G1, mexGH1-opmD, hcnABC et rhlAB, tous connus pour être dépendants de PqsE (Déziel et al., 2005), a été suivie en présence ou en absence de pyocyanine. L'ajout de pyocyanine a induit une augmentation de la transcription des gènes phz et mexG mais n'a eu aucun effet sur les deux autres opérons étudiés.

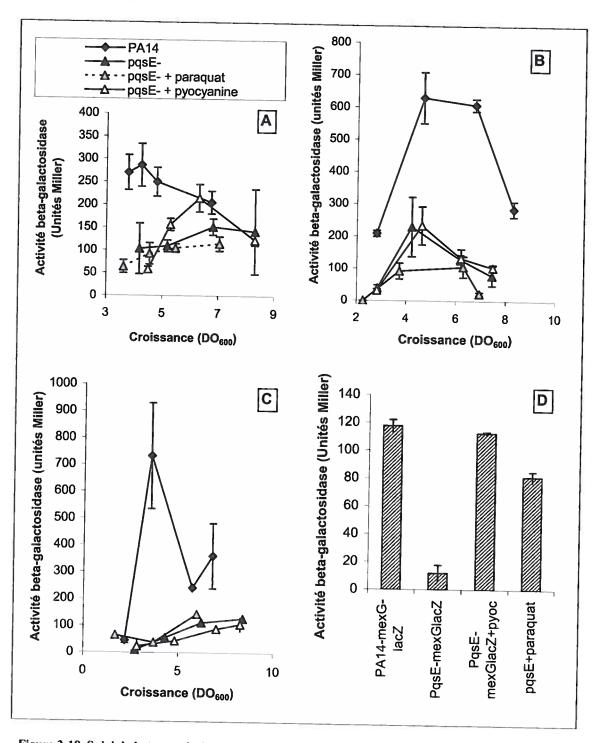


Figure 3-18. Suivi de la transcription de plusieurs rapporteurs transcriptionnels dans PA14 et chez le mutant $pqsE^-$ avec ou sans ajout de pyocyanine (20 mg/l) ou de paraquat (100 mM). (A) phzA1-lacZ (pMW303); (B) hcnA-lacZ (pME3826); (C) rhlA-lacZ (pECP60): (D) mexG-lacZ (pED1).

Si le seul rôle de PqsE était d'activer la production de pyocyanine, un mutant pqsE devrait avoir un phénotype identique à celui d'un mutant des gènes de biosynthèse de cette phénazine. Pour vérifier cette hypothèse, la transcription des gènes mexGHI et hcnABC a été suivie dans le double mutant phzCI-C2, bloqué dans la biosynthèse des phénazines. Alors que mexG-lacZ (Figure 3-19A) est diminué significativement dans ce double mutant comme chez le mutant pqsE, la transcription de hcnA ne semble pas affectée (Figure 3-19B), ce qui supporte les résultats obtenus lors d'un ajout exogène de pyocyanine (

Figure 3-18). Des résultats similaires à ceux pour *hcnA* ont été obtenus avec *rhlA-lacZ*, dont la transcription n'est pas affectée dans le double mutant. Ces résultats confirment que le mutant *pqsE* ne présente pas les mêmes phénotypes qu'un mutant bloqué dans la biosynthèse des phénazines, au moins pour la transcription des gènes *rhlA* et *hcnABC*.

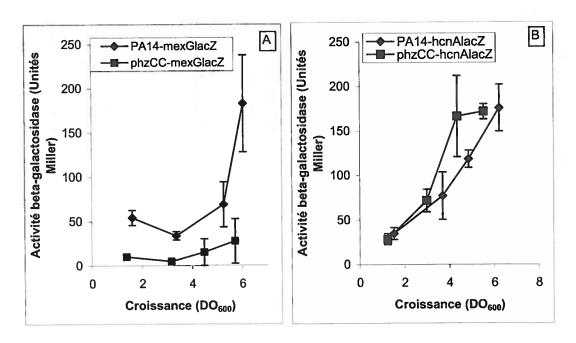


Figure 3-19. Transcription des gènes (A) mexG-lacZ (pED1) et (B) hcnA-lacZ (pME3826) dans le double mutant phzCTC2.

3.3.2.1.3 La pyocyanine est responsable du stress oxydatif induit par PqsE

Est-ce la pyocyanine qui influence la transcription des gènes phz et mexGHI, ou est-ce le stress oxydatif qu'elle génère qui en est responsable? Pour le savoir, le mutant pqsE a été exposé à du paraquat, un composé générant un stress oxydatif par la production d'anion superoxyde. Tel que montré à la

Figure 3-18, le paraquat possède la même influence que la pyocyanine sur trois des quatre groupes de gènes testés. La seule différence entre ces deux molécules est que la pyocyanine a induit la transcription des gènes de sa propre biosynthèse alors que le paraquat n'a eu aucun effet. Autrement dit, l'impact de la pyocyanine se résume par l'induction du stress oxydatif qu'elle génère et par l'auto-induction de sa propre biosynthèse.

Il existe trois types de stress oxydatifs : celui induit par l'anion superoxyde (généré par exemple par le paraquat), celui induit par le peroxyde d'hydrogène et celui induit par les hydroperoxydes organiques. La pyocyanine génère-t-elle seulement le stress induit par l'anion superoxyde, ou est-ce un stress oxydatif plus généralisé ? Pour le vérifier, la transcription de *mexG* a été suivie en présence de tous les types de stress oxydatifs connus et en présence de pyocyanine. La Figure 3-20 montre que seuls la pyocyanine et le paraquat ont induit la transcription de *mexG* chez le mutant *pqsE*-. Cet effet n'est pas visible chez la souche sauvage, probablement parce que la transcription de *mexG* est déjà maximale dans cette souche. Quant au H₂O₂ et aux hydroperoxydes organiques appelés BHP (tert-butyl-hydroperoxyde) et CHP (cumène hydroperoxyde), aucun n'a activé sa transcription. La pyocyanine génère donc un stress similaire à celui induit par le paraquat mais différent de celui induit par les autres composés testés.

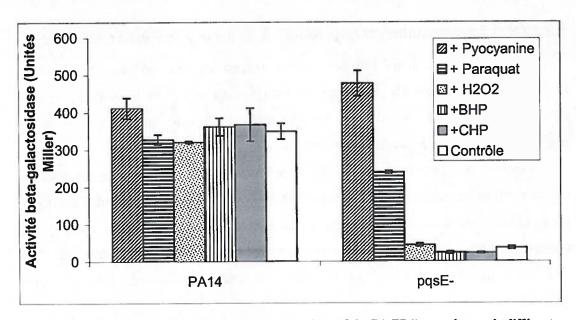


Figure 3-20. Activation du rapporteur transcriptionnel mexG-lacZ (pED1) en présence de différents inducteurs de stress oxydatif. L'échantillonnage a eu lieu à une DO₆₀₀ = 4. Les concentrations en pyocyanine, en paraquat, en BHP et en CHP sont reprises dans la section Matériel et méthodes (p. 185). La concentration finale en H_2O_2 est de 2 mM. Le H_2O_2 , le BHP et le CHP ont été ajoutés 30 minutes avant la mesure de l'activité β -galactosidase. La pyocyanine et le paraquat ont été ajoutés dès le début de la culture.

Finalement, je peux conclure que PqsE génère un stress oxydatif indirectement via son contrôle sur la production de pyocyanine. Ce stress, absent chez le mutant pqsE, est en effet induit lorsque la pyocyanine est ajoutée. Celle-ci produit le même effet qu'un inducteur de stress oxydatif connu, le paraquat. Par contre, la pyocyanine ou l'induction du stress oxydatif par un autre composé ne permet pas de complémenter les gènes affectés par une mutation dans pqsE qui ne sont pas sensibles au stress oxydatif, tels que rhlAB ou hcnABC. Ces expériences démontrent que PqsE agit en premier lieu sur la régulation des facteurs de virulence et autres gènes contrôlés par le QS dont la pyocyanine, et que l'induction du stress oxydatif qu'il génère n'est qu'une conséquence secondaire de cette première fonction.

3.3.2.2 Étude phénotypique du mutant pqsE

A ce stade du projet, j'ai démontré que le rôle principal de PqsE est d'affecter le QS et que le stress oxydatif qu'il induit n'est qu'une conséquence de cet effet. Puisque le QS est un réseau de régulation aussi vaste que complexe, toutes les données permettant de

détailler les facteurs affectés par PqsE pourront m'aider à identifier sa cible au sein du QS. C'est l'objectif des expériences qui suivent.

3.3.2.2.1 Comparaison entre pqsE, rhlR, phzCI C2 et la souche sauvage

Les données transcriptomiques publiées récemment (Hazan et al., 2010) montrent qu'une mutation dans le gène pqsE induit des variations transcriptionnelles affectant de nombreux gènes. Près de la moitié des gènes contrôlés par LasR et/ou RhlR sont également sous l'influence de PqsE. Dans le but de trouver de nouvelles pistes pour élucider la fonction de PqsE, il serait intéressant d'avoir une comparaison phénotypique exhaustive entre le mutant pqsE et la souche sauvage PA14. Pour confirmer que l'absence de pyocyanine n'est pas elle-même responsable du phénotype observé dans pqsE, il serait également intéressant de pousser plus loin la comparaison entre les mutants phzC1 C2 et pqsE. Enfin, puisque les analyses transcriptomiques des mutants pqsE et rhlR montrent un certain chevauchement dans les gènes affectés par ces mutations (Hazan et al., 2010; Hentzer et al., 2003), il serait aussi nécessaire d'avoir une large comparaison phénotypique de ces deux souches.

3.3.2.2.1.1 Les mutant rhlR et pqsE sont semblables mais non identiques

Avant de se lancer dans des études plus coûteuses, quelques analyses transcriptionnelles ont été réalisées pour comparer le mutant $rhlR^-$ et pqsE, comme cela avait été le cas avec le double mutant $phzC1^-C2^-$ (voir section 3.3.2.1.2 p. 214). L'opéron rhlAB est directement contrôlé par RhlR. Est-il transcrit de manière identique chez le mutant $rhlR^-$ et chez $pqsE^-$? Les résultats présentés à la Figure 3-21 montrent que la transcription de rhlAB, affectée chez le mutant $pqsE^-$, est toutefois supérieure à celle observée chez le mutant $rhlR^-$, ce qui suggère que PqsE et RhlR agissent différemment sur cette transcription.

L'expérience a été répétée en suivant la transcription du gène rhll, contrôlé directement aussi par RhlR. Le profil de sa transcription est identique entre la souche sauvage et le mutant pqsE, mais elle est significativement inférieure chez le mutant rhlR (Figure 3-21).

Ceci appuie le modèle selon lequel la fonction de PqsE ne se fait pas uniquement via RhlR.

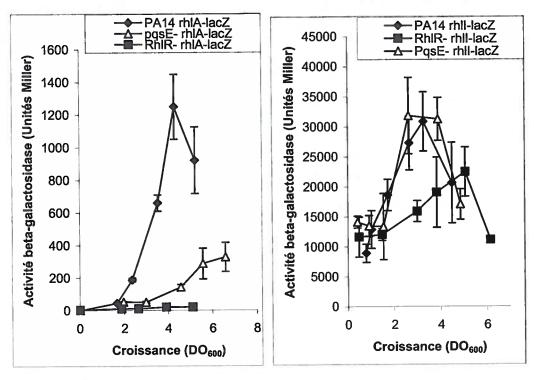


Figure 3-21. Transcription de *rhlA-lacZ* (pECP60) (graphique de gauche) et de *rhlI-lacZ* (pMW305) (graphique de droite) dans PA14, *pqsE* et *rhlR*.

3.3.2.2.2 Étude phénotypique par Microarrays^{TR} de Biolog

Puisque le mutant pqsE partage des points communs mais également des différences avec rhlR et phzCl C2, il faut trouver un moyen de les comparer de manière plus systématique. La technologie des Phenotype Microarrays (PM) a été développée par Biolog et permet de comparer la réponse cellulaire dans près de 2000 conditions de manière automatisée et simultanée (Bochner et al., 2001; Bochner, 2003). De nombreux phénotypes peuvent ainsi être analysés selon les composés testés : assimilation et transport de nutriments, métabolisme du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre, biosynthèse de petites molécules, biosynthèse de macromolécules polymériques, formation de structures cellulaires, métabolisme respiratoire, réponse au stress et autres propriétés cellulaires. Les PM utilisent la respiration cellulaire pour analyser la réponse de la bactérie exposée à un composé particulier. Les bactéries sont inoculées dans près de 2000 puits contenant chacun un composé à une concentration déterminée, ainsi qu'un sel de tétrazolium. Si la bactérie répond bien au composé testé, sa respiration cellulaire sera

optimale et réduira le tétrazolium pour générer un pigment pourpre caractéristique. Si la bactérie réagit moins bien au composé testé, sa croissance, et donc sa respiration, en seront affectées et moins de tétrazolium réduit sera produit. Ainsi, la quantification de l'intensité de couleur du tétrazolium réduit reflète l'activité métabolique cellulaire dans chacune des 2000 conditions testées.

Les souches PA14, pqsE, rhlR et phzC1 C2 ont toutes été analysées et comparées les unes aux autres au moyen des PM, en duplicata. Les résultats bruts peuvent être consultés en Appendice F. Un résumé des résultats significatifs est présenté dans le Tableau 3-4. Les trois mutants pqsE, rhlR et phzC1 C2 ont tous des caractéristiques spécifiques. La résistance de la souche rhlR à la chlortetracycline et à la minocycline sont des résultats attendus, puisque ce mutant possède un gène de résistance à la tétracycline (voir Appendice B). Il en est de même pour le mutant phzC1 C2 possédant un gène de résistance aux beta-lactamases telles que la carbénicilline, l'azlocilline, la phenetycilline et l'oxacilline.

Outre ces résistances attendues, le mutant $rhlR^-$ possède une activité métabolique supérieure aux autres souches en présence de plusieurs sources d'azote. Le mutant $pqsE^-$ possède une meilleure résistance à l'acide 5-fluoro-orotique (5FOA) par rapport aux trois autres souches. Enfin, il est intéressant de constater que la putrescine à pH 9,5 (stress induit par les polyamines, voir section 3.4.2.1, p. 307) et le 2,2-dipyridyl (un agent chélateur) inhibent le métabolisme de $pqsE^-$ par rapport à la souche sauvage, phénotype partagé avec $rhlR^-$ pour le premier composé et par $phzCl^-C2^-$ pour le second.

Ces résultats suggèrent que chacun des mutants testés possède des phénotypes qui lui sont propres, et que le rôle de PqsE n'est pas uniquement attribuable à un effet sur la pyocyanine ou sur RhlR.

Tableau 3-4. Tableau des composantes favorisant ou défavorisant la respiration cellulaire des souches PA14, pqsE, rhlR et phzCI C2 1'une par rapport à l'autre, par PM.

		Souches bactériennes favorisées en présence des composés mentionnés					
		PA14	pqsE	rhlR ⁻	phzC1 ⁻ C2 ⁻		
és			5FOA	Gly-Gly-D-Leu	Carbénicilline		
			His-Asp	Glu-Tyr	Azlocilline		
Soc			Chlorure	Leu-Met	Phenetycilline		
tuc			d'antimoine	Met-Ile	Oxacilline		
35				Tyr-Phe			
des				Gly-D-Ser			
es	4			His-Asp			
l sen	PA14			Chlortetracycline			
je	<u>a</u>			Minocycline			
en présence des composés s		pH 9,5 + putrescine		Gly-Gly-D-Leu	Carbénicilline		
Souches bactériennes défavorisées e mentionnés		2,2-dipyridyl		Glu-Tyr	Azlocilline		
				Leu-Met	Phenetycilline		
	tn			Met-Ile	Oxacilline		
	pqsE			Chlorotétracycline			
<i>dé</i>				Minocycline			
se l		putrescine	5FOA		NC		
l uu							
eri	ب ذ						
act	rhIR			HOPE PROPERTY.			
s p	_						
the.	2	2,2-dipyridyl	5FOA	NC			
по	Ç						
S	C						
	phzCI ⁻ CZ ⁻						
	_						

5FOA = acide 5-fluoro orotique. NC = non comparées. Les molécules en gras sont celles générant un phénotype nouveau chez les souches étudiées.

3.3.2.2.3 Confirmation des résultats obtenus par Biolog

Le phénotype le plus clair et qui semble caractériser le mutant pqsE par rapport aux trois autres souches est sa résistance en présence d'acide 5-fluoro-orotique. L'acide 5-fluoro orotique est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des pyrimidines (Boeke et al., 1984). C'est un dérivé fluoré de l'acide orotique, utilisé comme substrat par les enzymes PyrEF pour former de l'uridine mono-phosphate. En présence de 5-FOA, PyrEF génèrent du fluoro-uracile, qui bloque la méthylation de l'uracile en thymine. De plus, le 5-FU est phosphorylé en triphosphate (FUTP) et incorporé à la place de l'uracile dans les ARN. Pour confirmer les résultats obtenus par Biolog, les trois mutants pqsE, rhlR et phzCI C2 ainsi que la souche sauvage PA14 ont été cultivés en présence de différentes concentrations de 5-FOA. L'expérience a été réalisée dans le milieu TSB, dans le milieu

Biolog, dans des tubes à essais, dans des plaques de 96 puits et avec des concentrations variant de 0,2 à 2 mM. Aucune variation de croissance entre le mutant pqsE et les autres souches n'a été mise en évidence (Figure 3-22). Les résultats obtenus par Biolog n'ont donc pas pu être répétés au laboratoire.

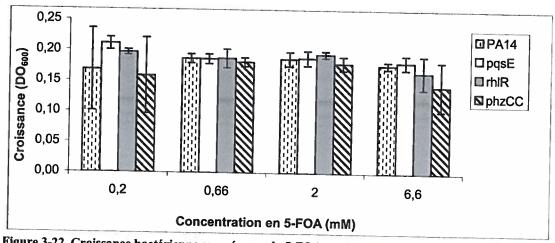


Figure 3-22. Croissance bactérienne en présence de 5-FOA. Expérience réalisée en 5 réplicats selon les paramètres utilisés par Biolog : plaques de 96 puits, milieu Biolog.

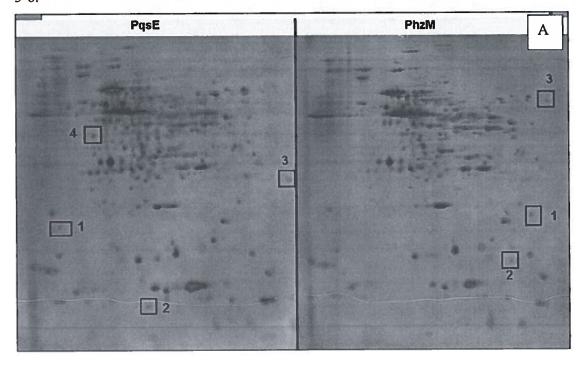
Étant donné les difficultés à reproduire les résultats obtenus par Biolog, ces données n'ont pas été approfondies davantage.

3.3.2.3 Étude du protéome du mutant pqsE

Jusqu'à présent, j'ai pu déterminer qu'une partie des gènes affectés dans un mutant $pqsE^-$ le sont à cause de l'absence de pyocyanine et du stress oxydatif qu'elle induit. Le lien entre PqsE et les autres gènes, non liés au stress oxydatif, qu'il affecte n'est pas connu, bien que le QS soit certainement impliqué. Afin de comprendre davantage ce lien, le protéome du mutant $pqsE^-$ a été analysé. Il a été comparé avec celui du mutant phzM, bloqué dans la dernière étape de la biosynthèse de la pyocyanine, afin d'identifier ce qui diffère une souche de l'autre. Ainsi, toutes les caractéristiques du mutant $pqsE^-$ en dehors de l'effet lié à l'absence de pyocyanine seraient identifiables lors de cette comparaison. L'étude s'est focalisée sur la fraction intracellulaire, puisque PqsE ne semble pas agir sur un constituant présent dans le surnageant.

3.3.2.3.1 Comparaison du mutant pqsE et du mutant phzM par gel de protéines bidimensionnel

Après une première comparaison des protéines intracellulaires de point isoélectrique situé entre pH 3 et 10, on observe qu'une forte concentration de protéines de situe au centre du gel. Leur point isoélectrique doit se situer à pH 5-7 environ. Pour augmenter leur séparation, une nouvelle comparaison a été réalisée en modifiant les conditions de la première dimension pour mieux séparer la migration des protéines de point isoélectrique de pH 5 à pH 6,5. Le protéome (fraction intracellulaire) des deux mutants est présenté à la Figure 3-23. L'identification des protéines différentiellement exprimées lors de ces deux comparaisons est détaillée dans le Tableau 3-5 et le Tableau 3-6.



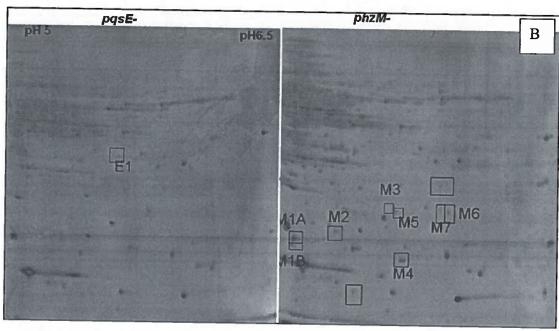


Figure 3-23. Comparaison des protéomes de pqsE et phzM par gels bidimensionnels, fraction intracellulaire.

Séparation des protéines de point isoélectrique situé entre (A) pH 3 à 10 et (B) pH 5 à 6,5. Les protéines séquencées par spectrométrie de masse sont encadrées.

Panneaux de gauche : protéome du mutant pqsE : 1 = VD-E1 ; 2 = VD-E2 ; 3 = VD-E3 ; 4 = VD-E4 ;

Panneaux de droite : protéome du mutant phzM : 1 = VD-M1 ; 2 = VD-M2 ; 3 = VD-M3.

Tableau 3-5. Liste des protéines produites seulement chez le mutant pqsE.

numéro de la protéine dans le gel	Nom de la protéine	Fonction prédite (1)
VD-E1	PA2504	Protéine hypothétique
VD-E2	PA0409 pilH	Protéine de motilité twitching
VD-E3	Kératine	Total de mounte twitching
VD-E4	PA1777 oprF	Précurseur de la protéine F de membrane
E1 (1) .	PA2197	hypothétique

⁽¹⁾ données publiées sur www.pseudomonas.com.

Tableau 3-6. Liste des protéines produites seulement chez le mutant phzM.

numéro de la protéine dans le gel	Nom de la protéine	Fonction prédite ⁽¹⁾	
VD-M1	PA1905 phzG2	Biosynthèse des phénazines	
VD-M2	PA1900 phzB2	Biosynthèse des phénazines	
VD-M3	PA4500	protéine de liaison des transporteurs ABC	
M1A et B	PA4211 phzB1	Biosynthèse des phénazines	
M2	PA3653 frr	Protéine de recyclage des ribosomes	
M3	PA1905 et PA4216 phzG	Biosynthèse des phénazines	
M4	PA1900 phzB2	Biosynthèse des phénazines	
M5	PA1900 phzB2	Biosynthèse des phénazines	
M6	PA1905 et PA4216 phzG	Biosynthèse des phénazines	
M7	PA1905 et PA4216 phzG	Biosynthèse des phénazines	

⁽¹⁾ données publiées sur www.pseudomonas.com.

L'absence de protéines de biosynthèse des phénazines chez le mutant pqsE confirme la bonne réalisation de l'expérience. Chez la souche pqsE, quatre protéines dont deux hypothétiques ont été identifiées comme plus abondantes que dans le chez le mutant phzM. La protéine PilH, dont le gène est surexprimé en absence de PqsE selon les données transcriptomiques (Hazan et al., 2010), intervient dans la mobilité de type twitching, bien que celle-ci ne soit pas affectée par PqsE (Rampioni et al., 2010). Quant à la protéine OprF, c'est l'une des protéines majeures de la membrane cellulaire responsable de la formation de pores dans celle-ci (Duchene et al., 1988). Enfin, deux autres protéines sont moins abondantes chez le mutant pqsE. L'une est hypothétique (PA2197) et l'autre, PA4500 ou DppA3, code un transporteur de type ABC impliqué dans le transport des acides aminés, des dipeptides et des hèmes (Kiely et al., 2008). Dppa3 possède des homologies avec la protéine DppA chez E. coli, impliquée dans le clivage des dipeptides cycliques (Olson et al., 1991).

3.3.2.3.2 Lien entre PqsE et les dipeptides cycliques ?

Il est intéressant de constater que le mutant $pqsE^-$ pourrait contrôler une protéine agissant sur les dipeptides. En effet, ces peptides peuvent jouer un rôle dans le QS. C'est le cas par exemple des di-kéto-pipérazines, qui se fixeraient sur des régulateurs de type LuxR (Holden et al., 2000; Holden et al., 1999). Dans les données transcriptomiques du mutant pqsE, deux opérons, PA1209 à 1215 et PA1216 à 1221, au sein desquels se retrouvent des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport d'acides aminés, sont

sous-exprimés. Ainsi, PA1219 possède un domaine COG3319 ou PF00975 (www.pseudomonas.com). C'est un domaine thioestérase typique des synthases de peptides. PA1221 possède un domaine COG1020 ou PF00501 également caractéristique de ces enzymes.

Puisque P. aeruginosa produit des di-kéto-pipérazines (Holden et al., 1999), seraitil possible que la fonction de PqsE soit de réguler la biosynthèse ou le transport des dipeptides, qui affecterait alors tout le QS?

Afin de vérifier si ces molécules sont affectées dans un mutant pqsE, j'ai comparé la présence des di-kéto-pipérazines chez pqsE et chez la souche sauvage, par LC/MS en électronébullisation positive. Aucune différence n'a été observée entre ces deux souches, ce qui suggère que PqsE n'affecte pas ces molécules. Leur production a également été détectée chez les mutants PA1214, PA1217, PA1221. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans la production des molécules de masse 168, 244 et 260 (pour rappel, les masses sont de 168 Da pour le cyclo(ΔAla-L-Val), de 260 pour le cyclo(L-Pro-Tyr) et de 244 pour le cyclo(L-Phe-L-Pro), voir 3.1.3.2.2.1, p. 172) dans aucune de ces souches par rapport à la souche sauvage (Figure 3-24). Les mutants PA4500 et PA4496 ont également été testés, le premier parce que la protéine PA4500 est absente dans un mutant pqsE selon les données sécrétomiques, et le second car il possède de grandes similitudes avec le premier. Ceux-ci ont montré une forte augmentation du cyclo(L-Pro-Tyr), dont la concentration est sept fois supérieure à celle de la souche sauvage chez le mutant PA4500 (dppA) et trois fois supérieure chez les mutants PA4496 (Figure 3-24). Ces gènes ont des similarités avec la dppA d'E. coli qui clive les dipeptides cycliques. En absence de ceux-ci, le dipeptide ne serait pas dégradé, ce qui pourrait expliquer son abondance chez les mutants PA4500 et PA4496. Il faut noter que le mutant PA4500 fait davantage de pyocyanine que la souche sauvage, ce qui pourrait confirmer l'influence des dipeptides sur le QS de P. aeruginosa. Néanmoins, ils ne sont pas absents dans pasE et ne sont donc pas responsables des phénotypes observés dans ce mutant. Afin de confirmer ces résultats, il sera toutefois nécessaire de confirmer la véritable identité des pics observés, en utilisant un standard commercial de ces dipeptides et en comparant les spectres de fragmentation de ceux-ci par LC/MS/MS.

Les HAQ et les AHL ont toutes été analysées chez les mutants PA4500, PA4496, PA1221, PA1217, PA1214 mais aucune différence n'a été observée par rapport à la souche sauvage.

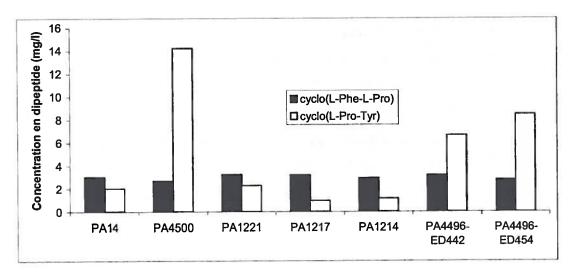


Figure 3-24. Production de di-kéto-pipérazines par différentes souches.

Les mutants utilisés proviennent de la banque de mutants officielle de *P. aeruginosa*. Le mutant PA4496 y est représenté deux fois, avec un site d'insertion différent pour les deux mutants (http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/search.cgi) (Liberati *et al.*, 2006).

Ces résultats suggèrent que PqsE n'intervient pas dans la modification ou la dégradation des dipeptides cycliques.

3.3.3 Lien entre PqsE et les HAQ

Le troisième objectif et grand volet de cette section Résultat est l'identification du substrat naturel de PqsE. Tenant compte du fait que (i) pqsE est le dernier gène d'un opéron impliqué dans la production de petites molécules-signal extracellulaires appelées HAQ, que (ii) la protéine qu'il code possède des homologies avec des hydrolases dont le substrat est en général une petite molécule et que (iii) cette protéine affecte de nombreux gènes régulés par le QS, la première hypothèse privilégiée au début de ma thèse était que PqsE est impliquée dans la dégradation ou la modification des HAQ.

3.3.3.1 Comparaison des profils de molécules extracellulaires entre la souche sauvage et le mutant pqsE⁻ par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (2D-TLC)

3.3.3.1.1 Analyse de la fraction extracellulaire non polaire

L'approche initiale a consisté en l'identification des molécules résultant de l'activité de PqsE en comparant les profils sur chromatographie en couche mince (TLC) d'extraits de cultures de la souche sauvage et du mutant pqsE. Ces cultures ont été nourries à l'acide anthranilique marqué au 14 C. Ce substrat étant radioactif, il s'ensuit que toutes les molécules dérivées de ce précurseur le seront également. Cette technique nous permet de comparer facilement la présence des HAQ dans les extraits de surnageant des deux souches étudiées. Les HAQ étant des composés non polaires libérés dans le milieu, la première étape a visé la comparaison de la fraction extracellulaire non polaire des deux cultures bactériennes prises en milieu (DO $_{600} = 3,4$) et en fin (DO $_{600} = 5$) de phase de croissance. La séparation des différentes molécules présentes dans ces fractions s'est faite par TLC en fonction de leur polarité.

Après cette première séparation unidimensionnelle, les échantillons prélevés en milieu de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire pour les deux souches ne présentaient pas de différence significative. Les expériences se sont poursuivies dès lors en se concentrant sur les échantillons prélevés à une $DO_{600} = 5$.

La première migration s'est révélée insuffisante pour comparer aisément les deux souches (Figure 3-25A). Afin de permettre davantage de séparation des différents éléments, une seconde séparation est nécessaire. La première dimension a été répétée et une deuxième séparation a eu lieu sur la même plaque en variant les solvants organiques utilisés, ce qui modifie la migration des molécules pour permettre une meilleure séparation de celles-ci. De très nombreuses conditions expérimentales ont été testées (temps de croissance des cultures, types de solvants, temps d'exposition au phosphorlmager, quantité de l'échantillon sur la plaque) afin d'optimiser la séparation des composants de l'échantillon. Celle-ci s'est faite perpendiculairement à la première dimension, ce qui a permis en définitive une séparation bidimensionnelle des molécules de l'échantillon.

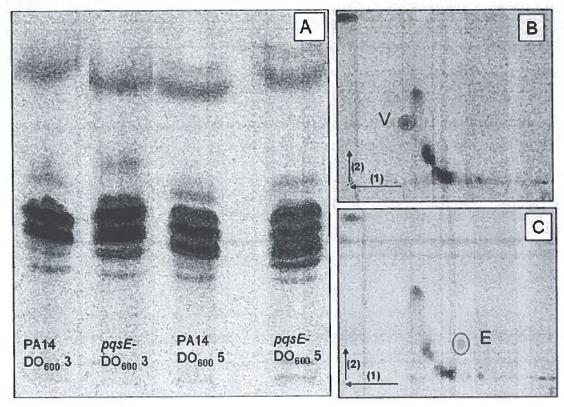


Figure 3-25. Détection des molécules non polaires extracellulaires chez PA14 et chez le mutant pqsE par phosphorimager.

(A) Première dimension de séparation chromatographique sur couche mince (TLC); (B) deux dimensions de séparation chromatographique de PA14 et (C) du mutant pqsE. Les flèches indiquent l'ordre et le sens des migrations. Les différences significatives sont encerclées.

De nombreuses molécules radioactives ont été détectées dans les deux échantillons (Figure 3-25B et C). Deux molécules semblent être différemment produites selon la souche utilisée, l'une seulement exprimée dans PA14 (molécule V) et l'autre seulement chez le mutant pqsE (molécule E). Celles-ci génèrent une légère ombre à leur emplacement lorsque les plaques de chromatographie sont exposées à un rayonnement UV d'une longueur d'onde de 254 nm.

3.3.3.1.1.1 Identification de la molécule V

3.3.3.1.1.1.1 3^{ème} et 4^{ème} dimension de séparation chromatographique

Étant donné la proximité de la molécule V par rapport aux autres molécules radioactives, celle-ci a été extraite de la plaque de silice pour être soumise à deux

séparations chromatographiques supplémentaires, en utilisant deux autres mélanges de solvants pour la migration. De cette manière, je suis parvenue à isoler entièrement la molécule, en vue de son identification par LC-MS.

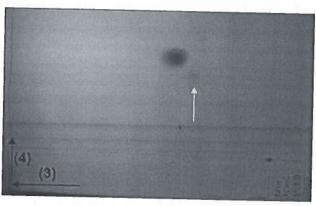


Figure 3-26. Visualisation aux UV (254 nm) de la 3ème et 4ème séparation chromatographique pour isoler la molécule V dans PA14.
Les flèches noires indiquent l'ordre et le sens de la migration, la flèche blanche indique l'emplacement de la molécule V.

3.3.3.1.1.1.2 La molécule V a un poids moléculaire de 144 Da

Afin d'identifier la molécule V, l'expérience a été répétée en absence de radioactivité pour injecter l'échantillon au LC-MS. Celle-ci a une masse de 144 (m/z + 1 = 145 en mode positif). Les fragments générés après collision sont présentés à la Figure 3-27. Ces données permettent de proposer plusieurs structures pour la molécule V : acide trans-b-hydromuronique, acide 2-oxoadipique, acide 3-oxoadipique, acide 3-oxoalipique, acide 3-oxo-l-cyclohexane carboxylique ou l'acide glutarique. Ce dernier présente un profil de migration différent de la molécule V et a donc été rapidement écarté.

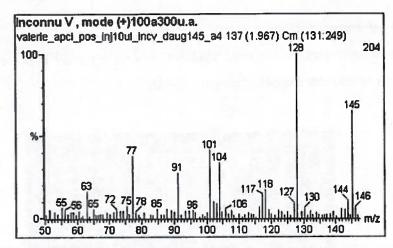


Figure 3-27. Profil de fragmentation de la molécule V par LC-MS-MS.

Les surnageants de plusieurs souches ont été analysés par spectrométrie de masse dans le but de déterminer la présence ou l'absence de la molécule V. On la retrouve chez PA14 mais elle est absente chez les mutants $pqsE^-$ et $pqsA^-$ (Figure 3-28A). En présence d'acide anthranilique tétradeutéré, il y a production d'un ion pseudomoléculaire de 149 Da qui migre au même temps de rétention que la molécule V (Figure 3-28B). La molécule V dérive donc de l'acide anthranilique, ce qui confirme les résultats obtenus avec l'acide anthranilique marqué au ¹⁴C.

Un ajout de HHQ ou de PQS tétradeutéré ne permet pas de marquer la molécule V, ce qui démontre que celle-ci n'est pas dérivée de ces molécules.

Afin de caractériser de manière préliminaire la molécule V, elle a été exposée à de la ninhydrine (2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione). La ninhydrine réagit avec les fonctions amines primaires et secondaires pour générer un composé coloré appelé pourpre de Ruhemann (Friedman, 2004). Aucune apparition colorée n'est apparue sur la plaque TLC contenant la molécule V, ce qui suggère que celle-ci ne possède aucune fonction amine.

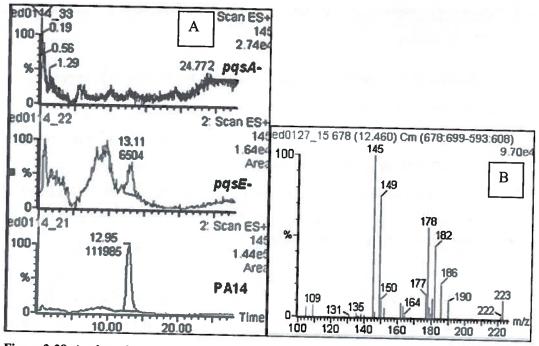


Figure 3-28. Analyse chromatographique et spectrométrique de la molécule V. (A) Présence de la molécule dans les souches PA14, pqsE et pqsA. (B) Marquage de la molécule V en présence d'acide anthranilique deutéré.

Les quantités de molécules V produites par PA14 varient énormément d'une expérience à l'autre. Il en est de même chez le mutant pqsE. Lorsque j'ai répété les tests de quantification de la molécule V dans ces deux souches, j'ai observé que le mutant pqsE pouvait en produire jusqu'à 43% de la quantité retrouvée chez PA14. Sa présence ne semble donc pas requérir celle de PqsE, même si ce dernier influence sa production. La molécule V n'est donc pas un produit de l'activité PqsE. Pour cette raison, son étude n'a pas été davantage approfondie dans le cadre de ce projet.

3.3.3.1.1.2 Identification de la molécule E

La molécule présente dans les cultures du mutant pqsE, mais non chez la souche sauvage, est suffisamment isolée après deux séparations chromatographiques pour être extraite. La séparation est donc répétée avec de l'acide anthranilique tétradeutéré (et donc non radioactif). La molécule E est ensuite extraite de la plaque de silice et analysée par

LC-MS, mais aucune molécule n'a pu être identifiée dans l'échantillon, tant en mode positif qu'en mode négatif.

3.3.3.1.2 Analyse des fractions extracellulaire polaire et intracellulaires polaire et non polaire

Nous avions pris la décision de regarder la fraction extracellulaire dans la mesure où elle regroupe la famille des HAQ. Néanmoins, il paraissait pertinent, afin d'obtenir un point de vue plus exhaustif, de ne pas négliger les autres fractions, c'est-à-dire la fraction extracellulaire polaire, ainsi que les composés intracellulaires polaires et non polaires.

Afin de vérifier si ces fractions contiennent des molécules radioactives, 1 ml de celles-ci a été passé au compteur à scintillation. Une forte radioactivité (Tableau 3-7) a été détectée dans la fraction extracellulaire polaire ainsi que dans la fraction intracellulaire non polaire. Elles ont donc été étudiées par TLC puis par révélation de la radioactivité au PhosphorImager.

Tableau 3-7. Détection de la radioactivité des différentes fractions de la souche sauvage PA14 et du mutant pqsE.

Fraction	polarité	Souche	DPM
Extracellulaire	Polaire	PA14	15834
		pqsE	24054
Cellulaire	Non polaire	PA14	20137
		pqsE	22818
	Polaire	PA14	1738
		pqsE	2412
Témoin négatif non radioactif (1)		1	30
Témoin positif radioactif (2)		1	102682

DPM = Désintégration Par Minute.

(1) Le témoin négatif provient de 1 ml de culture bactérienne non radioactive.

(2) Le témoin positif est un standard fourni par BECKMAN et contenant du ¹⁴C dont l'activité est de 10⁵ DPM (http://www.beckman.com/products/Consumables/analytical/scintillation/ls_standardsets con dcr.asp).

Les résultats obtenus sur TLC et TLC reversed-phase n'ont pas montré de profils différents entre la souche sauvage et le mutant pqsE. Il est à noter toutefois que la séparation chromatographique de la fraction polaire n'a pas été concluante car des

problèmes de reproductibilité nous empêchent de les analyser de manière efficace par TLC-reversed phase.

Afin d'amplifier les différences éventuelles dans la production des HAQ en présence ou en absence de PqsE, nous avons transformé le mutant avec deux plasmides. Le premier est un plasmide multi-copies (pLG10) contenant les gènes *pqsABCDE* sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Celui-ci possède donc les mêmes propriétés que la souche sauvage, mais produit davantage de HAQ. Le second (pLG12) lui est semblable à l'exception qu'il ne contient pas le gène *pqsE* (voir Appendice B). Leurs profils ont été comparés en utilisant le même protocole que précédemment. Ces résultats montrent que l'absence de la protéine PqsE n'affecte pas les dérivés de l'acide anthranilique.

Bien que la technique de TLC soit sensible et relativement reproductible, certains problèmes de trop faible résolution ont été rencontrés. La méthode reste fortement limitée dans sa capacité à quantifier précisément les molécules détectées ou à séparer deux molécules semblables. Dans notre situation, ces paramètres ne sont pas à négliger. En effet, notre hypothèse propose que PqsE puisse agir spécifiquement sur une molécule en la modifiant, par hydrolyse par exemple. Il est donc intéressant de pouvoir quantifier la proportion de chaque molécule présente dans l'échantillon et d'en connaître le poids moléculaire au dalton près, afin d'en détecter la moindre modification. Ces précisions peuvent être obtenues par l'usage du LC-MS.

3.3.3.2 Analyse et quantification des dérivés de l'acide anthranilique chez la souche sauvage et chez le mutant pqsE par LC/MS

Les études comparatives réalisées par chromatographie sur couche mince ont permis d'affirmer de manière qualitative que, hormis les composés V et E, tous les composés non polaires dérivés de l'acide anthranilique semblent présents autant chez la souche sauvage que chez le mutant PqsE. Afin maintenant de vérifier l'abondance relative de chacun de ces composés dans les deux souches étudiées et de détecter d'éventuelles modifications de ceux-ci qui auraient pu être invisibles en TLC, des analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées. Le laboratoire de spectrométrie de masse du Dr François Lépine a élaboré un protocole de détection des HAQ par LC/MS

(Lépine et al., 2004), permettant une quantification aisée des HAQ et des molécules qui leur sont apparentées.

3.3.3.2.1 Le mutant pqsE n'est pas affecté dans la production de HHQ, de PQS ou de HQNO

La première étape a été la réalisation d'une cinétique de production des HAQ principaux, c'est-à-dire le HHQ, le PQS et le HQNO. Les résultats obtenus indiquent clairement que ces trois HAQ ont une cinétique de production rigoureusement similaire entre la souche sauvage et le mutant pqsE (Figure 3-29), ce qui confirme les données obtenues par chromatographie sur couche mince. Ces résultats ont également été confirmés par la comparaison entre pqsE (pLG10 (pqsABCDE)) et pqsE (pLG12 (pqsABCD)), où aucune différence n'a été mise en évidence (Figure 3-29). La pyocyanine a également été quantifiée dans ces souches. Comme attendu, les souches exprimant pqsE produisent de la pyocyanine, tandis que les autres n'en produisent pas du tout (Figure 3-29).

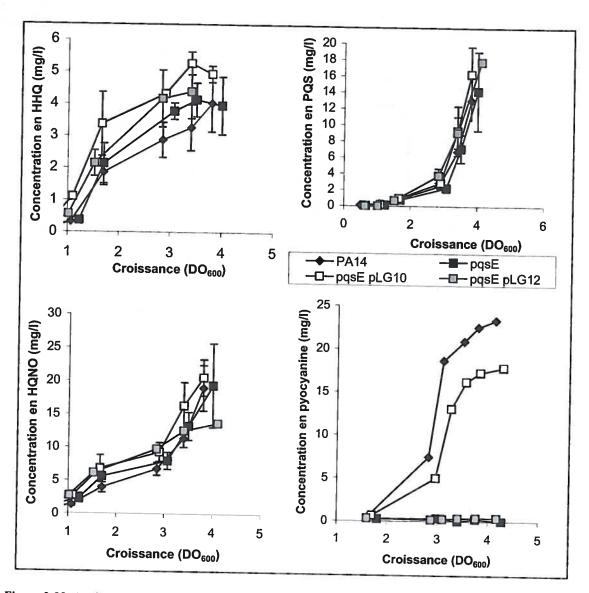


Figure 3-29. Analyse du surnageant des cultures de PA14 et du mutant pqsE : cinétique de production des HAQ.

3.3.3.2.2 Analyse de la production du DHQ chez le mutant pqsE

Lorsque le DHQ a été découvert et que les analyses par LC-MS ont été optimisées pour cette molécule, j'ai également quantifié sa production chez le mutant pqsE. La Figure 3-30 montre que la production de DHQ est semblable chez la souche sauvage et chez le mutant pqsE en début de production, mais que celle-ci diminue chez la souche sauvage à partir d'une $DO_{600} = 4$ tandis qu'elle continue à augmenter chez le mutant pqsE.

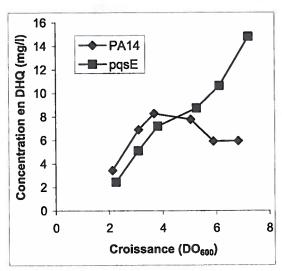


Figure 3-30. Production de DHQ (A) chez le mutant pqsE et chez la souche sauvage.

3.3.3.2.3 Analyse des dérivés de l'acide anthranilique chez le mutant pqsE et chez la souche sauvage

3.3.3.2.3.1 Détection des dérivés de l'acide anthranilique de polarité semblable au PQS, HHQ et HQNO

Afin de vérifier si les dérivés de l'acide anthranilique autres que le PQS, le HHQ et le HQNO sont affectés par l'absence de PqsE, je les ai également analysés par spectrométrie de masse. Les échantillons préparés en vue d'une analyse par LC/MS ont été obtenus en utilisant le même protocole que celui appliqué pour les analyses TLC. Cette fois, les cultures bactériennes ont été supplémentées avec de l'acide anthranilique deutéré sur quatre de ses atomes de carbone. Les dérivés de l'acide anthranilique seront ainsi également tétradeutérés et facilement reconnaissables par spectrométrie de masse. En effet, le profil des dérivés de l'acide anthranilique est caractérisé par un pic correspondant à la masse moléculaire de la molécule et d'un pic plus loin avec quatre daltons supplémentaires, correspondant à la molécule équivalente deutérée. Par cette technique, réalisée en cinq réplicats, aucune différence reproductible dans les molécules tétradeutérées observées n'a été détectée entre la souche sauvage et le mutant pqsE). La technique a été répétée avec l'extrait non polaire intracellulaire des deux souches mais n'a montré aucune différence entre celles-ci non plus.

3.3.3.2.3.2 Détection des dérivés de l'acide anthranilique de polarité semblable au DHQ

Puisque les méthodes de détection des molécules moins polaires telles que le PQS, le HHQ et le HQNO sont différentes de celles nécessaires à la détection des molécules plus polaires telles que le DHQ, il est intéressant de répéter l'analyse avec le programme HPLC adapté au DHQ. Celle-ci a permis d'identifier trois molécules, de masse m/z +1 de 279, 295 et 323, présentes uniquement chez le mutant *pqsE*. Ces molécules ont été nommées respectivement VD279, VD295 et VD323.

3.3.3.2.4 Identification des molécules VD279, VD295 et VD323

3.3.3.2.4.1 Ces trois molécules ne sont présentes qu'en absence de PqsE

Une fois ces molécules observées, il a fallu s'assurer de la reproductibilité de l'observation. Plusieurs échantillons préparés pour diverses autres expériences indépendantes ont été ré-analysées (Tableau 3-8). Sur les 14 analyses de souches ayant une mutation dans le gène pqsE, 13 d'entre elles ont produit du VD279, du VD295 et du VD323. Sur les 15 analyses de souches possédant le gène intact, dont le mutant pqsE complémenté en trans avec le plasmide pDN19pqsE, aucune n'a produit de ces 3 molécules. Ces données suggèrent très fortement que la présence du gène pqsE est directement liée à l'absence des trois molécules observées.

Tableau 3-8. Détection des molécules VD27	O, VD295 et VD323 dans vingt-neuf analyses LC-MS.
---	---

								264	
7			279		295		323		10mg/l ⁽²⁾
souche	échantillon MS	date		aire		aire	_	aire	
PA14	val 10oct PA14_4	10-oct-07	10,8	0		0		0	
lasR	val 10oxt lasR controle	10-oct-07	10,8	0		0		0	1374657
rsaL	val 10oct rsaL 4	10-oct-07	10,8			0		0	1059466
rsaLpqsE G33	val 10oct G33_4	10-oct-07	10,81	37559	10,24	4044	7,43	9686	854625
	val 10oct G33 lasR_4	10-oct-07	10,81	26102		2979	7,36		914022
rsaLpqsE G49	val 10oct G49 4	10-oct-07	10,82	27561	10,32	3301	7,44	8105	
	val_10oct_G49_lasR_4	10-oct-07	10,9	25683	10,32	3515	7,36	10514	831678
PA14	ED0013_44	23-nov-07							
lasR	ED0013_45	23-nov-07							
pqsA	ED0013_33	23-nov-07							
pqsE pDN19pqsE	ED0013_35	23-nov-07							
pqsE	ED0013_34	23-nov-07	12,66	5635	10,6	3908	7,4	0	230937
lasR rhiR+	val 28sep2007 lasRpUCPSKrhlR4_inj2	28-sept-07	10,8	0	0		7,4	0	1275787
lasRpqsE rhlR+	val 28sep2007 lasRpqsEpUCPSKrhlR4_inj2	28-sept-07			10,15	4122			1677679
G49	val 28sep2007 bouteille6 g49 inj2	28-sept-07			10,31				1008489
PA14	val 28sep2007_bouteille9_PA14_inj2	28-sept-07							828530
G33	val 28sep2007_bouteille7_pas Detiquette_inj2						7,4	0	13544774
G33 lasR		28-sept-07			10,32	5848	7,36	18028	1237653
G49lasR	val 28sep2007 bouteille3 g49lasrPLUS inj2	28-sept-07		7641	10,32	73,53	7,35	29654	1038656
PA14	ED0012 38	16-nov-07	12,09	- 0	11	(7,3	0	423005
pqsE	ED0012_37	16-nov-07		19503	10,98				503231
PA14	PA14 03	19-juil-05	11	0	10,6		7,4	0	1
pqsA pDN19pqsE	pqsa_pdn19_pqse_03	19-juil-05							
pgsE pDN19pgsE	pqse_pdn19_pqse_03	19-juil-05							
PA14	valerie_espmp_19aout_pa14_2_temps6_inj1	19-août-05	5,7	' (5,4	1 ()/	/	T
pqsE	valerie_espmp_19aout_pqse6_inj1	19-août-05	5,71	13463	5,46	14399)/	/	/
		44 4/ 5/	100		46.6			-	400045
PA14	14aout_val_PA14	14-août-07			10,2				
pqsEphzA1lacZ ispho/14aout_val_pqsEisphoA1		14-août-07							
pqsEphzA1lacZ ispho/14aout_val_pqsEisphoA2			10,86	2207	10,19	215		2 1118	494239

(1) temps de rétention de la molécule ; (2) aire observée pour 10 mg/l de standard interne (PQS tétradeutéré, m/z + 1 = 264).

3.3.3.2.4.2 Les molécules VD279 et VD295 s'extraient à l'acétate d'éthyle

Dans le but de concentrer et de purifier ces trois molécules, une extraction à l'acétate d'éthyle a été réalisée sur le surnageant du mutant pqsE. La fraction non polaire a été concentrée 25 fois. Les molécules VD279 et VD295 ont été détectées dans la fraction d'acétate d'éthyle, tandis que seulement des traces de la molécule VD323 ont été observées dans les mêmes conditions. Aucune trace n'est observée pour aucune des trois

molécules dans la fraction polaire aqueuse restante. La même expérience a été réalisée avec le surnageant de la souche sauvage PA14, et aucune de ces molécules n'a été détectée (Figure 3-31 et Figure 3-32).

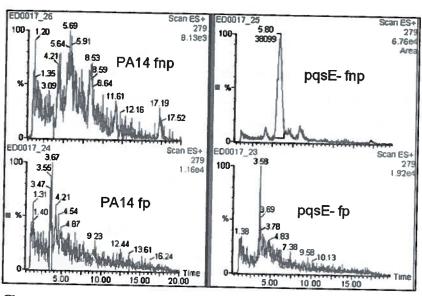


Figure 3-31. Chromatogramme de la molécule VD279 dans PA14 et chez le mutant pqsE. finp = fraction non polaire d'acétate d'éthyle concentré 25x. fp = fraction aqueuse polaire obtenue après l'extraction d'acétate d'éthyle.

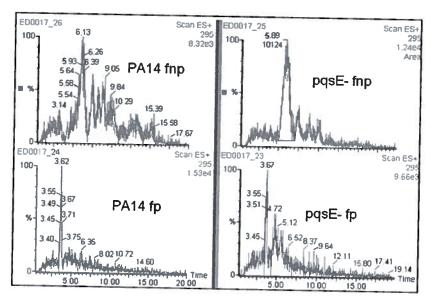


Figure 3-32. Chromatogramme de la molécule VD295 dans PA14 et chez le mutant $pqsE^-$, finp = fraction non polaire d'acétate d'éthyle concentré 25x. fp = fraction aqueuse polaire obtenue après l'extraction d'acétate d'éthyle.

3.3.3.2.4.3 Les trois molécules sont dérivées de l'acide anthranilique

Afin de déterminer si ces trois molécules sont des dérivés de l'acide anthranilique, un mutant pqsE a été exposé à 20 mg/l d'acide anthranilique tétradeutéré. Un extrait à l'acétate d'éthyle concentré 50 fois a été analysé par LC-MS. La Figure 3-33 montre que ces trois molécules sont deutérées dans ces conditions. Ceci confirme qu'elles dérivent toutes trois de l'acide anthranilique.

Plusieurs informations doivent être soulignées face aux résultats obtenus. Premièrement, la molécule 323 possède exactement le même temps de rétention que le DHQ (m/z + 1 = 162). Une étude plus poussée à permis de déduire que la molécule VD323 est en réalité un artefact expérimental causé par l'analyse MS. Il s'agit de deux molécules de DHQ qui se sont associées lors de l'ionisation (m /z + 1 = (161 +161)/1 + 1 = 323). Celle-ci ne sera donc plus étudiée par la suite. Deuxièmement, on constate que les molécules VD279 et VD295 sont doublement marquées, puisque l'on peut observer un pic à + 4 mais également à + 8 Da. Ces molécules contiennent donc deux noyaux provenant de l'acide anthranilique marqué. Enfin, on note une molécule marquée de m/z + 1 = 200. Celle-ci se retrouve aux mêmes temps de rétention que les molécules VD279 et VD295. Elle est toutefois présente dans PA14. Elle ne sera donc pas davantage étudiée ici.

Des cultures supplémentées d'acide anthranilique marqué au ¹⁵N révèlent également un double marquage des molécules VD279 et VD295, ce qui signifie que ces deux composés possèdent le groupement amine de deux acides anthraniliques.

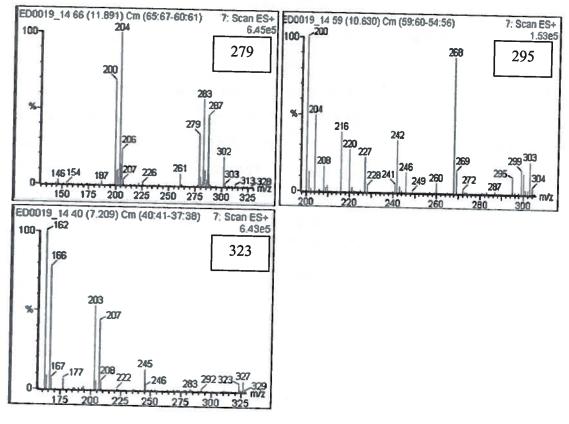


Figure 3-33. Spectres de masse des molécules VD279 et VD295 produites en présence d'acide anthranilique tétradeutéré.

3.3.3.2.4.4 Fragmentation des molécules VD279 et VD295

Pour déterminer la structure moléculaire des molécules VD279 et VD295, je les ai fragmentées par MS-MS. Cette méthode permet de sélectionner une molécule de masse connue, de la fragmenter et d'analyser par spectrométrie de masse le poids des fragments obtenus. J'ai réalisé cette fragmentation sur les molécules non marquées, simplement et doublement marquées. Les Figure 3-34 et Figure 3-35 présentent le spectre de masse des profils de fragmentation des molécules VD279 et VD295 respectivement, marquées et non marquées. Plusieurs informations peuvent être déduites de ces résultats. Premièrement, la fragmentation démontre bel et bien que les molécules observées aux masses m/z+1 = 283 et 287 sont bien la molécule VD279 contenant une et deux molécules d'acide anthranilique tétradeutéré respectivement, puisque les fragments obtenus après collision sont marqués de 4 Da par rapport à ceux provenant de VD279 non

marqué. La même interprétation peut être déduite pour la molécule VD295 et les ions pseudomoléculaires de m/z+1 = 299 et 303.

La fragmentation de la molécule VD279 donne trois fragments majoritaires de masse m/z+1 = 120, 158 et 186. Lors de la génération du fragment 186, un fragment de 279 - 186 = 93 est également généré. Celui-ci pourrait correspondre à l'acide anthranilique (137) dans lequel un groupement COOH (masse de 45 Da) aurait été remplacé par un hydrogène (+1). Le fragment 120 provient de VD279 qui aurait perdu un fragment de 158, visible sur le spectre également. Le fragment 158 pourrait être dérivé du fragment 186 duquel se serait détaché un groupement CO ou (CH₂)₂ (28 Da).

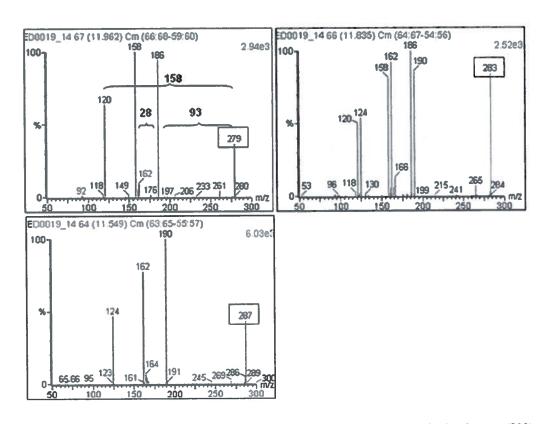


Figure 3-34. Profil de fragmentation par LC-MS-MS de la molécule VD279, simplement (283) et doublement (287) marquée.

Dans le cas de la molécule 295, les fragments majoritaires sont les fragments 120, 158, 186 et 202 (Figure 3-35). Les molécules VD279 et VD295 ont donc de nombreux fragments communs, ce qui signifie qu'elles ont une structure similaire. Le fragment supplémentaire retrouvé uniquement dans VD295 est le 202. Une différence de 16 Da

existe entre VD279 et VD295, tout comme entre les fragments de m/z+1=186 et 202. Ces résultats suggèrent que VD295 est un produit hydroxylé de la molécule VD279, et que cette hydroxylation a lieu sur le fragment de m/z+1=186 pour générer le fragment m/z+1=202.

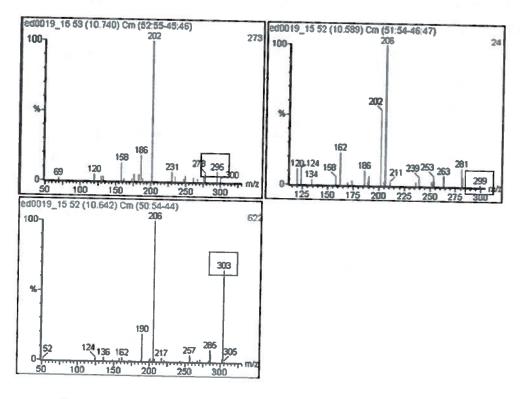


Figure 3-35. Profil de fragmentation par LC-MS-MS de la molécule 295, simplement (299) et doublement (303) marquée.

Puisque les molécules VD279 et VD295 sont fortement apparentées et que VD279 est plus facile à extraire et à concentrer, seul cette dernière sera approfondie dans ce travail.

3.3.3.2.4.5 VD279 est un produit de l'opéron pqsABCDE

Afin de s'assurer que VD279 est un produit de l'opéron pqsABCDE, le surnageant des mutants de l'opéron a été analysé. Seul le mutant pqsE produit le VD279. Ceci suggère que les quatre autres enzymes sont nécessaires à sa biosynthèse. À cette étape, les hypothèses à considérer sont que PqsE (i) empêche la transformation ou (ii) catalyse la disparition de la molécule VD279. Toutefois, puisque tous ces mutants sont non

polaires, il se peut également qu'il y ait suffisamment de PqsE produit pour dégrader la molécule VD279. Pour contrer ce problème, j'ai traité des cultures du mutant pqsE avec des inhibiteurs de la synthèse des HAQ. Le 4-CABA et le 6-FABA, connus pour inhiber les HAQ probablement via PqsA, ont bloqué la production de VD279. La molécule B (2-bromo-N-(3-fluorophényl) acétamide), connue pour vraisemblablement bloquer seulement PqsB et PqsC, a également inhibé la production de VD279 dans ce mutant (Figure 3-36). Ceci indique que VD279 nécessite les enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD pour être synthétisé.

Un ajout de HHQ ou de PQS tétradeutéré ne génère pas de molécules marquées de masse m/z+1 = 283 et/ou 287, ce qui signifie que VD279 n'est pas un produit dérivé de ces deux HAQ. Un ajout de DHQ ou d'acide kynurénique ne permet pas non plus d'augmenter la production de VD279, ce qui suggère qu'ils ne sont pas des précurseurs de cette molécule. Inversement, un ajout de VD279 à une culture du mutant *pqsA*⁻ non polaire ne génère aucune production de HAQ, ce qui indique qu'elle n'est pas un intermédiaire de la biosynthèse de ceux-ci.

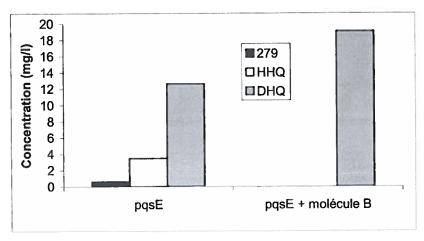


Figure 3-36. Détection par LC-MS de plusieurs produits de l'opéron pqsABCDE en présence de l'inhibiteur B chez le mutant pqsE.

3.3.3.2.4.6 La molécule VD279 ne possède pas de noyau indole

Afin de déterminer si VD279 possède un noyau indole, du tryptophane pentadeutéré a été donné au mutant *pqsE* et un marquage de +4 Da fut observé. Cette perte d'un marquage signifie que le noyau indole de 5 carbones du tryptophane a été transformé

d'abord en acide anthranilique pour donner un noyau benzoïque de 4 carbones avant de générer le VD279.

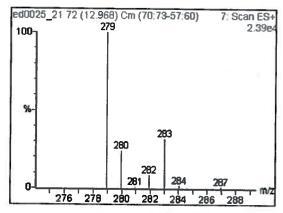


Figure 3-37. Marquage de VD279 : Analyse LC-MS du surnageant du mutant pqsE exposé à 50 mg/l de tryptophane pentadeutéré.

3.3.3.2.4.7 La présence de VD279 ne dépend pas de la pyocyanine ni de RhlR

VD279 est une molécule retrouvée à ce jour exclusivement dans des cultures d'un mutant pqsE. Puisque ce mutant possède des points communs avec le mutant rhlR selon les données transcriptomiques et avec le mutant $phzCI^-C2^-$ pour l'absence de pyocyanine, j'ai vérifié la présence de VD279 dans le surnageant de ces souches. Aucune trace de VD279 n'a été détectée dans ces deux mutants, ce qui signifie que la production VD279 n'est pas due à l'absence de phénazines ni ne dépend de RhlR. Elle semble réellement liée à l'absence de PqsE uniquement.

3.3.3.2.4.8 Optimisation de la production de VD279

Pour identifier VD279, il est nécessaire d'en purifier une quantité importante. Ceci permettra d'étudier plus en profondeur sa structure et son effet biologique.

Afin de déterminer le temps où la concentration de cette molécule est maximale dans le surnageant du mutant pqsE, une cinétique de production a été réalisée. La Figure 3-38 montre que VD279 s'accumule dans le temps. Toutefois, un échantillon pris 12 heures après le dernier point présenté dans cette figure montre une baisse de concentration de la molécule. La concentration la plus élevée de VD279 dans le

surnageant se situe après environ 9 heures de culture, lorsque la DO₆₀₀ atteint 7 environ. Le profil de production de la molécule 295 est identique à celui de VD279.

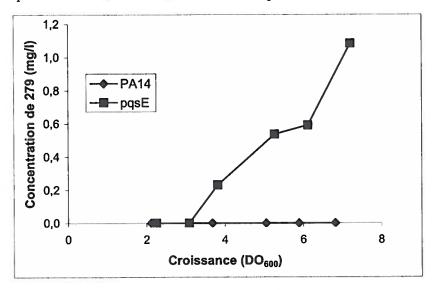


Figure 3-38. Cinétique de production par LC-MS de VD279 dans le surnageant du mutant pqsE.

Plusieurs conditions expérimentales ont été testées pour optimiser la production de VD279. Ces conditions sont présentées à la Figure 3-39. Le mutant pqsE exprimant en trans les gènes pqsABCD sur le plasmide pLG12 a été utilisé afin de déterminer s'il produisait plus de molécules VD279 et VD295. La production n'a pas été augmentée lors de la surexpression des quatre premiers gènes de l'opéron pqs. Par contre, si de l'acide anthranilique est ajouté dans ces mêmes conditions, on obtient une meilleure production de VD279. La surexpression de mvfR sans ajout d'acide anthranilique chez le mutant pasE permet également d'augmenter la production de VD279. Ceci indique que l'opéron phnAB, sous le contrôle de MvfR, est impliqué dans la production d'acide anthranilique nécessaire à la biosynthèse du VD279. La production n'est pas augmentée si on surexprime seulement pqsA (pDN18pqsA), ce qui confirme que VD279 nécessite la présence de PqsB, PqsC et PqsD pour être synthétisé. Plusieurs concentrations d'acide anthranilique ont été ajoutées dans la culture du mutant pasE surexprimant les gènes pqsABCD (pLG12). Jusqu'à une concentration de 200 mg/l d'acide anthranilique ajouté, la concentration en VD279 augmentait. Une concentration supérieure à 200 mg/l (500 et 1000 mg/l) n'a pas permis de produire davantage de VD279.

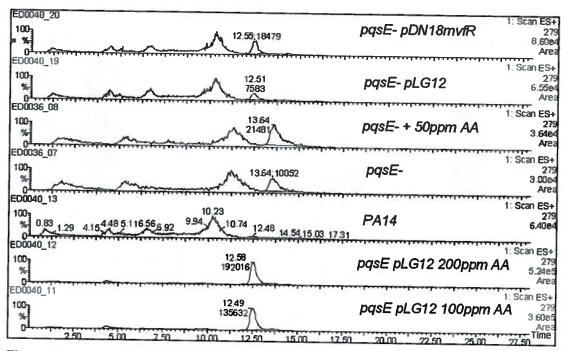


Figure 3-39. Quantification de la production de VD279 par LC-MS dans différentes conditions expérimentales.

La molécule éluant à environ 12,5 min. correspond au VD279. L'acide anthranilique est rajouté lorsque les cultures bactériennes atteignent une densité optique de 2. Les souches possédant un plasmide sont cultivées en présence de l'antibiotique. Les échantillonnages sont faits après 9 heures de culture, lorsque la densité optique atteint 6-7.

Différents milieux de culture ont également été comparés. Les milieux M9, M63, King A et TSB ont été inoculés avec le mutant *pqsE* surexprimant *pqsABCD* (pLG12) et en présence de 200 mg/l d'acide anthranilique. Les échantillons ont été pris après 8 heures et 24 heures de culture. Les résultats sont présentés à la Figure 3-40. Le milieu TSB a donné la meilleure production. La production de VD279 n'augmente plus significativement après 8 heures de culture. Le milieu TSB a donc été conservé pour la production de VD279.

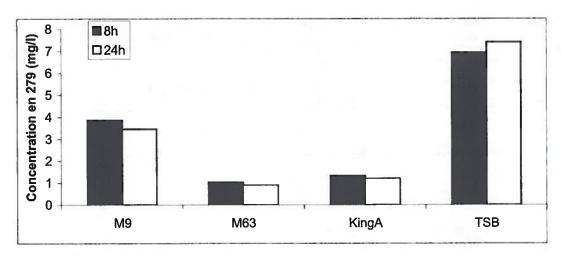


Figure 3-40. Analyse LC-MS de la production de VD279 par le mutant pqsE pLG12 (pqsABCD) avec ajout de 200 mg / l d'acide anthranilique dans différents milieux de culture.

La densité cellulaire après 8 heures de cultures était de : 0,55 (M9), 3,05 (M63), 4,54 (KingA) et 4 (TSB).

La densité cellulaire n'a pas été analysée à 24 heures à cause de la formation d'agrégats causés par la vieillesse de certaines cultures bactériennes (débris cellulaires et autres).

En conclusion, les conditions optimales de production de VD279 sont :

- milieu TSB (200 ml dans des flacons de 2 litres),
- souche pqsE pLG12,
- ajout d'acide anthranilique (200 mg/l) à une DO₆₀₀ de 2 (Pour rappel, l'acide anthranilique est toujours ajouté lorsque la biosynthèse des HAQ s'amorce afin de limiter son utilisation dans d'autres voies métaboliques telles que celle du tryptophane),
- incubation à 34°C sous agitation (240 rpm),
- extraction du surnageant de culture obtenu après 9 heures d'incubation.

3.3.3.2.4.9 Conditions de purification de VD279 et analyse par RMN

Les conditions de production présentées plus haut ont été utilisées pour générer le VD279 en grande quantité. Le surnageant de culture est récupéré et stocké au besoin à 4°C. Il n'est pas nécessaire d'ajouter du méthanol dans le surnageant afin de détacher le VD279 des cellules avant l'extraction, car aucune différence dans la quantité récupérée n'a été observée avec ou sans ajout de méthanol. Une extraction à l'éther est inefficace pour récupérer le VD279. Le surnageant obtenu est donc extrait à l'acétate d'éthyle à pH neutre puis concentré (voir matériel et méthodes section 2.2.2.1 p. 69). L'extrait a été

purifié sur TLC par Sylvain Milot (laboratoire du Dr. François Lépine) pour récolter une solution de VD279 la plus pure possible en vue d'une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN). Une purification à 95% a été obtenue.

L'analyse de VD279 par RMN des atomes d'hydrogène a confirmé la présence de deux noyaux aromatiques. Les résultats obtenus sont joints en Appendice I. L'analyse par RMN des atomes de carbone a échoué, ceci dû à la dégradation de VD279 et à l'apparition d'un précipité à l'intérieur de l'instrument.

Par conséquent, la suite du travail s'est concentrée sur l'étude de la fonction de VD279 afin de déterminer si celle-ci est en lien avec PqsE; ceci avant de recommencer tout le processus de production et de purification de la molécule.

Selon les données obtenues par RMN et par analyse LC-MS-MS, les deux structures les plus plausibles de VD279 ont été déterminées et sont présentées à la Figure 3-41. Sa formule serait du $C_{17}H_{14}N_2O_2$.

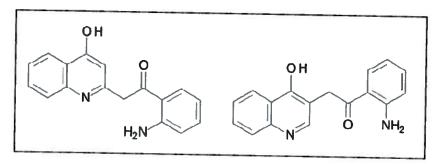


Figure 3-41. Structures hypothétiques du VD279.

3.3.3.2.5 Lien entre PqsE et le VD279

3.3.3.2.5.1 PqsE dégrade-t-il le VD279 ?

Puisque le VD279 n'est visible qu'en absence de PqsE, la première hypothèse proposée est que cette protéine dégrade la molécule. Pour le vérifier, un extrait du surnageant de pqsE contenant le VD279 tétradeutéré (m/z + 1 = 283) a été ajouté à une culture de la souche sauvage PA14 (DO₆₀₀ = 3), du mutant pqsE (DO₆₀₀ = 3) et dans un milieu de culture stérile, le TSB. La Figure 3-42A montre que le VD279 tétradeutéré a été dégradé par la souche sauvage mais est resté stable dans la culture du mutant pqsE et

dans le milieu TSB. Ceci suggère que VD279 nécessite la présence de PqsE pour être dégradée.

L'expérience a été répétée dans une souche d'*E. coli* JM109 exprimant en *trans* le gène *pqsE via* le plasmide pDN19*pqsE*, afin de garantir le rôle direct de PqsE sur le VD279. Près de 4 heures après l'ajout de VD279, aucune dégradation n'est visible chez la souche exprimant PqsE (Figure 3-42B). Un dernier échantillon a été prélevé 18 heures après l'ajout de la molécule dans la culture bactérienne. Aucune dégradation n'a été observée. Ce résultat suggère que la dégradation du VD279 n'est pas réalisée par la protéine PqsE directement.

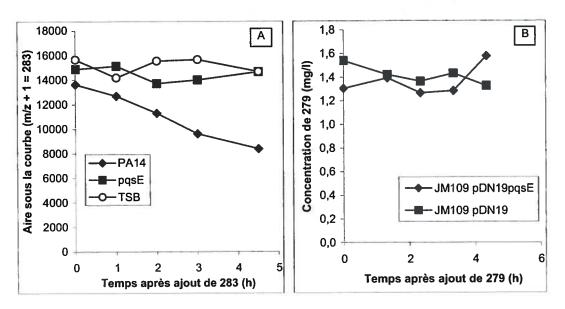


Figure 3-42. Analyse de la dégradation du VD279 marqué (m/z+1 = 283) dans différentes souches de P. aeruginosa PA14 (A) et d'E. coli JM109 (B) exprimant ou non le gène pqsE.

Puisque la dégradation du VD279 par des bactéries exprimant PqsE serait indirecte, j'ai émis l'hypothèse que la pyocyanine est responsable de cette dégradation. Pour le vérifier, j'ai mélangé 4 mg/l de VD279 en présence ou non de 60 mg/l de pyocyanine, dans une solution aqueuse. Le suivi de la dégradation s'est réalisé toutes les 30 min. durant 12 heures. Aucune dégradation du VD279 n'a été observée (Figure 3-43). Ceci confirme que la pyocyanine n'a aucun effet direct sur la dégradation du VD279, comme cela avait déjà été suggéré au point 3.3.3.2.4.7, p. 247.

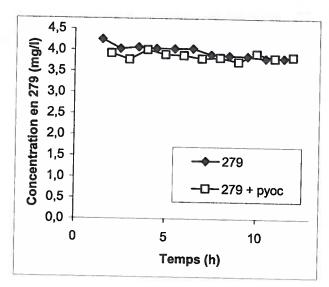


Figure 3-43. Détection par LC-MS de la dégradation du VD279 en présence de pyocyanine dans un milieu abiotique.

3.3.3.2.6 Fonction biologique du VD279

3.3.3.2.6.1 Le VD279 n'a aucun effet antimicrobien

Quelle est la fonction de cette nouvelle molécule ? Un disque stérile contenant une solution concentrée du VD279 a été déposé sur une gélose couverte d'un tapis de plusieurs souches bactériennes disponibles dans le laboratoire : *P. aeruginosa* PA14, *E. coli, Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Aucune de ces souches n'a présenté d'inhibition de croissance à proximité du disque, ce qui suggère que cette molécule ne possède aucune propriété antibactérienne contre celles-ci.

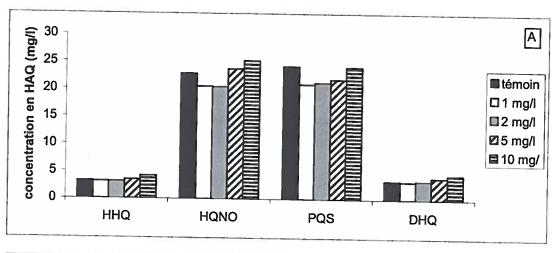
La production de pyocyanine, qui est également un composé toxique, a été suivie chez la souche sauvage exposée à du VD279, mais aucune différence n'a pu être observée.

3.3.3.2.6.2 Le VD279 n'affecte pas la production des HAQ

Puisque le VD279 est un produit de l'opéron pqsABCDE et que plusieurs des produits de biosynthèse de cet opéron sont connus pour être impliqués dans la régulation de sa propre transcription, j'ai analysé l'effet d'un ajout de VD279 sur l'activité de l'opéron. J'ai suivi la production des HAQ en présence ou en absence d'un ajout d'une

solution de VD279 pure à 95%, chez la souche sauvage et chez le mutant *pqsE*. Aucun effet n'a été observé en présence d'un ajout de 1 à 10 mg/l de VD279 chez aucune des deux souches (Figure 3-44A). Ceci démontre que la molécule n'a pas d'effet sur la production des HAQ.

Pour confirmer ces données, j'ai également suivi la transcription de l'opéron pqsABCDE au moyen d'un rapporteur transcriptionnel pqsA-lacZ (pGX5). Aucune différence n'a été observée en présence ou en absence de VD279, tant chez la souche sauvage que chez le mutant pqsE (Figure 3-44B). Par contre, la transcription de pqsABCDE est doublée en présence de VD279 chez le mutant pqsA (Figure 3-45). Cette augmentation est toutefois nettement inférieure à celle produite par un ajout de PQS. Cet effet vient probablement de sa relative ressemblance avec les ligands naturels de MvfR, le HHQ et le PQS.



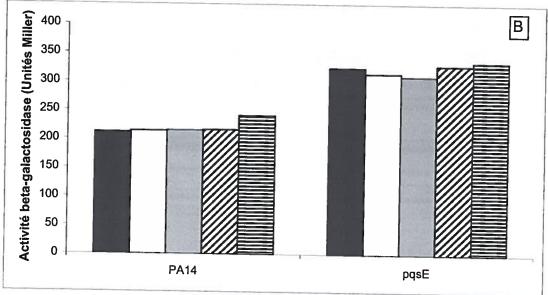


Figure 3-44. Analyse LC-MS de la production des HAQ chez la souche sauvage PA14 (A) et transcription de l'opéron pqsABCDE (pGX5) (B) en présence de plusieurs concentrations de VD279 dans PA14 et dans pqsE.

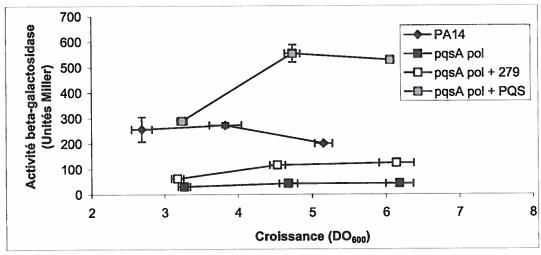


Figure 3-45. Analyse de la transcription de *pqsA-lacZ* (pGX5) dans un mutant *pqsA* en présence de 10 mg/l de VD279 ou de PQS.

Étant donné le peu d'effet biologique du VD279, ainsi que les évidences montrant que celui-ci n'est pas le substrat direct de PqsE, l'étude de cette molécule a donc été écartée du projet PqsE.

En conclusion, les très nombreuses expériences liées à la recherche d'un lien direct entre les dérivés de l'acide anthranilique, précurseur de la famille des HAQ, et PqsE ont mené à la conclusion que cette enzyme n'agit pas directement sur cette famille de molécules.

3.3.3.3 PqsE affecte la régulation de l'opéron pqsABCDE

3.3.3.1 La transcription des gènes de l'opéron pqsABCDE est augmentée dans un mutant pqsE

Pour quelle raison le gène pqsE se retrouve au sein d'un opéron de biosynthèse des HAQ alors qu'il n'intervient pas dans leur biosynthèse? Ce gène intervient-il d'une manière ou d'une autre dans le système des HAQ? Lors de l'étude comparative entre les mutants $rhlR^-$ et $pqsE^-$, on observe que la transcription de l'opéron est fortement activée par rapport à la souche sauvage (Figure 3-46).

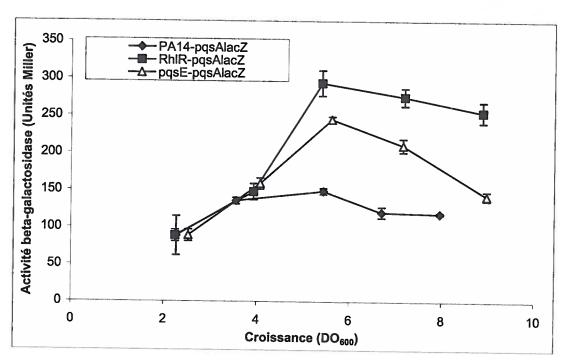


Figure 3-46. Activité beta-galactosidase du rapporteur pqsA-lacZ (pGX5) chez la souche sauvage et les mutants pqsE et rhlR.

Comment peut-on expliquer que la transcription de l'opéron soit augmentée chez le mutant pqsE mais que la production de HAQ ne le soit pas ? Afin de déterminer si cela pouvait être dû à une limitation de substrat, j'ai suivi la production d'acide anthranilique chez le mutant pqsE par rapport à la souche sauvage. La Figure 3-47A montre que le surnageant d'un mutant pqsE possède une concentration en acide anthranilique inférieure à celle trouvée chez la souche sauvage. Un excès d'acide anthranilique (50 mg/l) dans ce mutant ne permet toutefois pas d'avoir une plus forte production de HAQ dans le mutant pqsE par rapport à la souche sauvage (Figure 3-47B, C, D). L'acide anthranilique n'est donc pas un facteur limitant dans la production des HAQ chez pqsE. La transcription des gènes phnAB, impliqués dans l'une des voies de biosynthèse de l'acide anthranilique (voir section 2.1.4.2.1, p. 45) a été suivie chez le mutant pqsE à l'aide d'un rapporteur transcriptionnel phnAB-lacZ. Aucune différence significative n'a été observée entre ce mutant et la souche sauvage. Ce n'est donc pas à cause d'une faible transcription des gènes phnAB que le mutant pqsE produit peu d'acide anthranilique.

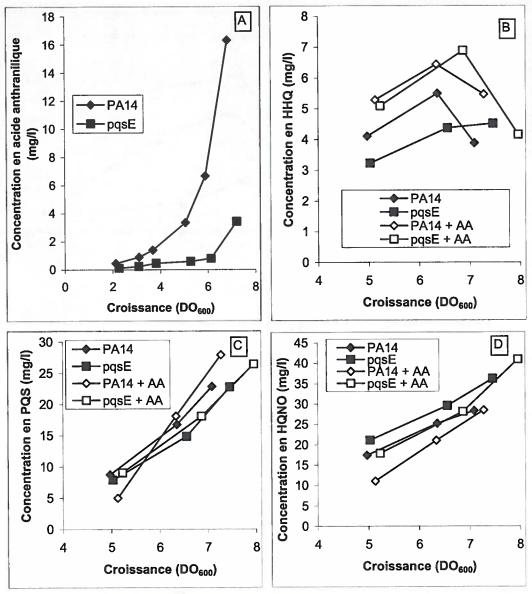


Figure 3-47. Quantification par LC-MS de la production (A) d'acide anthranilique et des (B, C, D) HAQ chez le mutant *pqsE* par rapport à la souche sauvage en présence ou non de 50 mg/l d'acide anthranilique (AA).

Pour confirmer et quantifier les différences d'expression de l'opéron entre les mutants pqsE, rhlR et la souche sauvage, j'ai suivi la transcription de pqsA (pGX5) et de mvfR (pGX1) dans ces trois souches. Plusieurs constructions de rapporteurs transcriptionnels fusionnés à différentes portions des promoteurs de pqsA (pGX6) et de mvfR (pGX2) sont disponibles. Les promoteurs tronqués ne possèdent plus la séquence de type lux par laquelle RhlR pourrait exercer sa régulation (Xiao et al., 2006b). Cette

expérience permettra de vérifier si RhlR et PqsE agissent de la même manière sur la régulation de l'opéron pqsABCDE et de mvfR.

La

Figure 3-48 montre que la transcription de mvfR est diminuée chez les mutants pqsE et rhlR et que RhlR exerce une régulation supplémentaire via séquence de type lux présente sur le promoteur de ce gène. En effet, en absence de cette séquence (pGX2), sa régulation est identique à celle présente dans un mutant pqsE, mais en sa présence (pGX1), le manque d'activation est accentué.

Dans le cas de la régulation de l'opéron pqsABCDE, on observe une forte augmentation de sa transcription chez les mutants $pqsE^-$ et $rhlR^-$ (pGX5), mais celle-ci disparaît en absence de la séquence lux présente sur son promoteur (pGX6). Dans cette situation, la régulation de l'opéron est identique entre la souche sauvage et le mutant $pqsE^-$, tandis qu'elle est même légèrement diminuée chez le mutant $rhlR^-$. Cette différence entre les deux mutants peut toutefois s'expliquer par la plus faible transcription de mvfR chez le mutant $rhlR^-$ par rapport au mutant pqsE (voir le graphique pGX1,

Figure 3-48).

En conclusion, PqsE et RhlR exercent une régulation similaire sur la transcription de *mvfR* et de l'opéron *pqsABCDE*, en stimulant la première et en diminuant la seconde. Néanmoins, l'effet de RhlR sur ces deux transcriptions est plus marqué que celui de PqsE. Dans le cas de la transcription de *mvfR*, RhlR semble avoir une action positive supplémentaire à celle de pqsE *via* une séquence *lux*. Dans l'expression de *pqsA*, RhlR et PqsE agissent de deux manières différentes. La première régulation est générée par leur effet positif sur la transcription du régulateur MvfR, tandis que la seconde est une régulation négative nécessitant une séquence *lux*, mais l'effet de RhlR sur celle-ci est nettement supérieur à celui de PqsE.

Si les résultats présentés ici montrent donc que RhIR peut agir indépendamment de PqsE sur la transcription de *mvfR*, ils ne permettent toutefois pas de déterminer si PqsE agit lui aussi de manière indépendante.

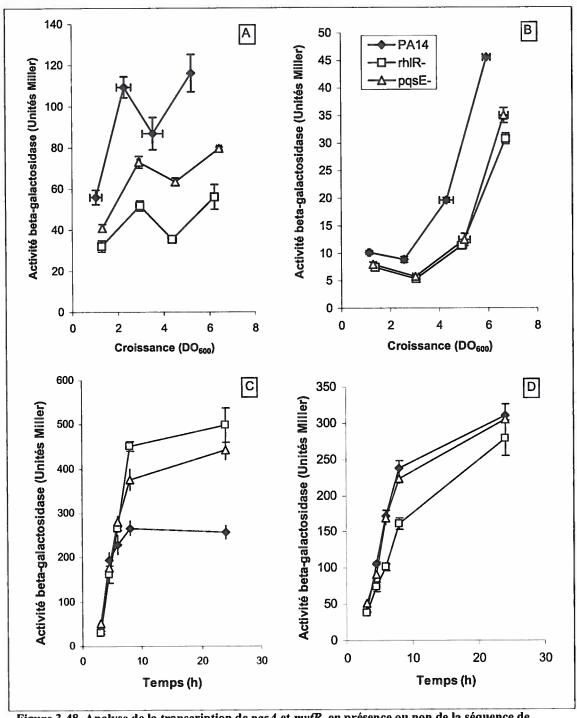


Figure 3-48. Analyse de la transcription de pqsA et mvfR en présence ou non de la séquence de reconnaissance lux dans leur région promotrice.

(A) rapporteur transcriptionnel pGX1, contenant le promoteur complet du gène pqsA. (B) rapporteur transcriptionnel pGX2, contenant le promoteur complet du gène mvfR. (C) Rapporteur transcriptionnel pGX5, contenant le promoteur tronqué de pqsA (absence de la séquence de reconnaissance lux). (D) Rapporteur transcriptionnel pGX6, contenant le promoteur tronqué de mvfR (absence de la séquence de reconnaissance lux).

L'augmentation de la transcription de l'opéron pqsABCDE ne se reflète pas dans la production de HAQ chez le mutant pqsE. Par contre, ce mutant produit davantage de DHQ en fin de phase logarithmique (Figure 3-30). Le mutant rhlR réagit-il également de la même manière ? Pour le vérifier, la production de DHQ a été quantifiée par LC-MS dans les souches PA14, pqsE et rhlR. La Figure 3-49 montre que si la production de DHQ est supérieure à celle de la souche sauvage chez le mutant pqsE, elle est toutefois inférieure chez le mutant rhlR. C'est également le cas chez le mutant rhlI, qui a généré une baisse de production de DHQ identique à celle observée chez rhlR. Une cinétique de production de DHQ a également confirmé ces résultats. Ceci suggère que le contrôle de la production de DHQ par RhlR et PqsE n'est pas exclusivement le même.

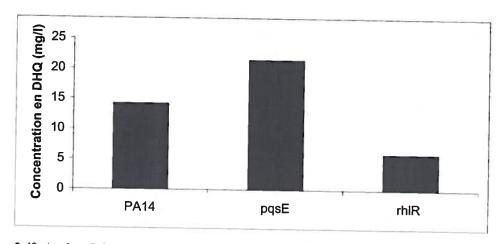


Figure 3-49. Analyse LC-MS de la production de DHQ chez la souche sauvage, pqsE et rhlR à DO₆₀₀ de 6.

3.3.3.3.2 La transcription des gènes de l'opéron pqsABCDE et les HAQ sont diminués lorsque pqsE est surexprimé

Si l'absence de PqsE induit une augmentation de la transcription de l'opéron pqsABCDE, on s'attend à observer une diminution de celle-ci si pqsE est surexprimé. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai analysé la transcription de l'opéron dans une souche exprimant de manière constitutive pqsE (pDN19pqsE). Comme attendu, celle-ci est inférieure lorsque PqsE est surexprimé (Figure 3-50A), ce qui confirme bien son rôle inhibiteur sur la régulation de l'opéron.

L'augmentation de la transcription de l'opéron n'est pas reflétée dans la production des HAQ, puisqu'aucune différence n'est visible entre pqsE et PA14. Lors de la surexpression de pqsE, la transcription est diminuée. Les HAQ le sont-ils également ? Ceux-ci ont été suivis par LC-MS chez la souche sauvage, chez le mutant pqsE et chez la souche surexprimant pqsE (Figure 3-50B). De manière surprenante, la surexpression de PqsE a une importante influence sur la production de HHQ, puisque celle-ci est fortement diminuée dans cette condition.

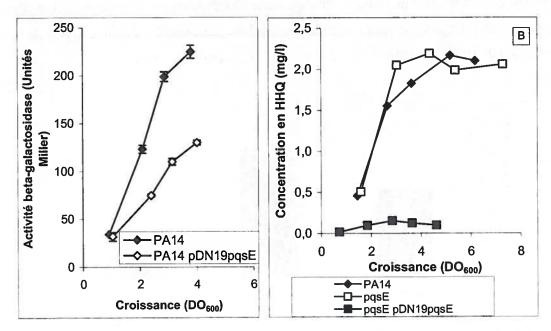


Figure 3-50. Transcription de *pqsA-lacZ* (A) et quantification LC-MS des HAQ (B) dans PA14 surexprimant ou non *pqsE*.

3.3.3.4 Les HAQ sont nécessaires à l'activation de la transcription de pgsE mais ne sont pas impliqués dans la fonction de la protéine PqsE

Les sections précédentes démontrent que PqsE n'intervient pas dans la production, la modification ou la dégradation des HAQ les plus communs, soit le HHQ, le HQNO et le PQS. Le suivi des dérivés de l'acide anthranilique par LC-MS-MS et par TLC montre qu'aucune différence visible, hormis pour les molécules VD279 et VD295, n'a été observée. Tous ces tests n'ont donc pas permis d'établir clairement le lien entre PqsE et les HAQ. Hormis pour l'activation de l'opéron, les produits de l'opéron pqsABCDE sontils nécessaires à la fonction de PqsE ? L'hypothèse soulevée est que PqsE agisse

indépendamment de ces molécules-signal. Afin de vérifier cette affirmation, nous avons transformé un mutant $pqsA^-$ polaire, dans lequel l'opéron pqsABCDE en entier est inactivé, avec un plasmide (pDN19-pqsE) exprimant de manière constitutive le gène pqsE uniquement.

L'un des phénotypes les plus marqués de l'absence de PqsE est le manque de pyocyanine dans la culture bactérienne, visible par une absence totale du pigment bleu caractéristique de *P. aeruginosa*. Toutes les mutations affectant l'opéron *pqsA-E* donnent ainsi des cultures sans pyocyanine. Dans l'hypothèse où PqsE ne nécessite pas la présence des HAQ pour fonctionner, un mutant *pqsA* ne produisant aucun HAQ et contenant un plasmide exprimant PqsE devrait être complémenté et produire la pyocyanine. Ce test a été réalisé et a montré une complémentation totale du mutant *pqsA* (pDN19-*pqsE*), dont la production en pyocyanine était supérieure à celle de la souche sauvage (Figure 3-51). Ce résultat prouve que PqsE agit indépendamment des HAQ. La production de HAQ a été vérifiée chez la souche *pqsA* (pDN19*pqsE*) produisant de la pyocyanine. Aucun de ceux-ci n'a été détecté, ce qui confirme que PqsE agit indépendamment d'eux. Cette expérience confirme hors de tout doute que les HAQ sont seulement nécessaires à l'activation de la transcription de *pqsE* mais non à sa fonction.

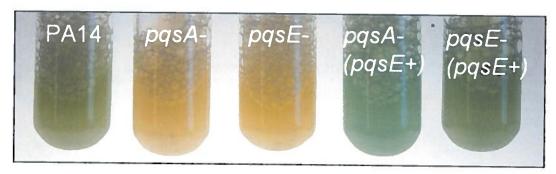


Figure 3-51. Production de pyocyanine chez des mutants complémentés par pqsE.

3.3.4 Lien entre PqsE et les AHL

Les différentes approches biochimiques et microbiologiques utilisées dans l'étude de la production ou de la modification des HAQ chez le mutant pqsE ont permis de démontrer que la protéine PqsE n'agit aucunement sur ceux-ci mais qu'ils sont nécessaires pour activer la transcription du gène qui la code.

Si PqsE n'agit pas sur les HAQ, il se peut toutefois qu'il puisse agir sur d'autres molécules-signal telles que les AHL. Cette hypothèse est en accord avec le fait que PqsE possède des homologies avec des hydrolases, dont les substrats sont en général de petites molécules. Elle s'accorde également avec la forte inhibition d'un bon nombre de gènes régulés par le QS chez un mutant $pqsE^-$.

Bien que PqsE influence de nombreux gènes régulés par le QS, la transcription des gènes *lasR et rhlR* orchestrant ce dernier n'est pas ou peu affectée dans un mutant *pqsE* selon les données transcriptomiques disponibles. Il est toutefois possible que notre protéine agisse indirectement sur ces régulateurs par l'intermédiaire de leurs autoinducteurs, les AHL. Ces molécules peuvent en effet être dégradées par hydrolyse du lien ester du noyau cyclique de l'homosérine lactone (Figure 3-52) (Frommberger *et al.*, 2005). Dans l'hypothèse où PqsE est une hydrolase, il est utile de vérifier son action éventuelle sur ces molécules.

Figure 3-52. Mécanisme d'hydrolyse du cycle aromatique des AHL. R = Chaîne carbonée de longueur variable. Adapté de Frommberger *et al.* (2005).

3.3.4.1 Analyse de la production des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant pqsE⁻ par essai biologique

Il existe de nombreux outils mis au point pour détecter la présence d'AHL dans un échantillon (Ravn et al., 2001). L'un de ceux-ci implique l'utilisation d'une souche mutante de la bactérie Chromobacterium violaceum. Cette bactérie produit un pigment, la violacéine, régulé par un système de QS. Un mutant déficient dans son système de QS présente un phénotype incolore, ce qui est le cas du mutant CV026. En présence d'homosérines lactones exogènes, le QS est activé ou inhibé, ce qui restaure ou inhibe la production de violacéine.

La production de molécules réagissant avec C. violaceum CV026 chez la souche sauvage PA14 et chez le mutant pqsE a été comparée. Un extrait non polaire du

surnageant de ces souches a été séparé par TLC. La plaque a ensuite été exposée au mutant CV026 avec et sans C₄-HSL pour localiser la présence des AHL à courte et à longue chaîne, respectivement. Ces résultats ont montré une même induction de violacéine chez PA14 et chez pqsE (Figure 3-53A et B). La production et la dégradation du C₄-HSL ne sont donc pas affectées par PqsE. Si l'induction de violacéine reste semblable dans les deux souches, j'observe toutefois qu'à une DO₆₀₀ de 4 une inhibition de la violacéine est également présente (Figure 3-53B). Puisqu'il semblerait qu'au moins une AHL à chaîne courte co-élue avec une AHL à chaîne longue, je décide de tester un nouveau solvant dans le but d'améliorer la séparation des différents composés.

Lors de la détection des AHL à chaîne longue, deux zones d'inhibition ont été observées uniquement chez la souche sauvage (Figure 3-53C). Afin de vérifier si celles-ci sont dues à la présence d'AHL ou à un composé ayant empêché la croissance de C. violaceum, l'agar au niveau de l'inhibition est récupéré, dissous avec un tampon phosphate et réinoculé sur une gélose contenant de la kanamycine pour sélectionner C. violaceum. Aucune croissance n'a été observée, ce qui démontre que l'inhibition n'était pas due à la présence d'AHL mais à celle d'un composé antibactérien produit par PA14 et absent dans pqsE. Étant donné son profil de migration sur TLC, il est plausible que ce composé soit la pyocyanine.

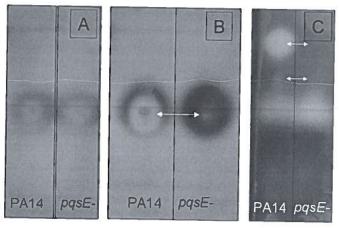


Figure 3-53. Bio-essai : Détection des AHL chez PA14 et pqsE par C. violaceum CV026.

(A) Détection (production de violacéine) des AHL à courte chaîne (égale ou inférieure à 8 carbones), DO₆₀₀ = 2. (B) Détection (production de violacéine) des AHL à courte chaîne (égale ou inférieure à 8 carbones), DO₆₀₀ = 4. (C). Détection des AHL à longue chaîne carbonée (inhibition de production de violacéine). Les flèches blanches identifient les différences observées entre la souche sauvage PA14 et le mutant pqsE.

En conclusion, aucune différence n'a été observée dans la production d'AHL chez la souche sauvage par rapport au mutant pqsE.

3.3.4.2 Étude de la dégradation des AHL par PqsE

L'avantage du bio-essai présenté à la section précédente était de pouvoir suivre la production de toutes les AHL en une seule méthode. De plus, elle permettrait de détecter d'autres molécules extracellulaires affectant l'activité de régulateurs de type LuxR. Par contre, cette méthode est nettement moins sensible que l'analyse par LC-MS. Elle est également limitée par la méthode de chromatographie utilisée. Si deux composés intéressants migrent au même endroit sur la plaque TLC, l'un pourrait masquer l'effet de l'autre. Pour ces raisons, les AHL majoritaires de *P. aeruginosa* ont été suivies spécifiquement par LC-MS chez la souche sauvage PA14 et chez le mutant *pqsE*.

Puisque l'hypothèse à vérifier est l'éventuelle hydrolyse des AHL par PqsE, un suivi de leur dégradation a été réalisé. Le culot cellulaire obtenu à partir de 4 ml d'une culture (DO₆₀₀ = 4) du mutant *pqsE* ou du mutant *pqsE* complémenté avec pDN19*pqsE* est dissous dans 750 μl de tampon phosphate à pH 6,5 et en présence de zinc, dans l'éventualité où PqsE nécessiterait du zinc pour fonctionner. Une quantité de 1 mg/l de C₄-HSL et de 3-oxo-C₁₂-HSL a été ajouté, et le suivi de leur stabilité a été analysé par LC-MS. La Figure 3-54 montre qu'aucune différence significative n'est observée pour les deux molécules-signal, en présence ou en absence de PqsE. On observe une dégradation du 3-oxo-C₁₂-HSL après 3 heures d'incubation, mais celle-ci est indépendante de la présence de PqsE.

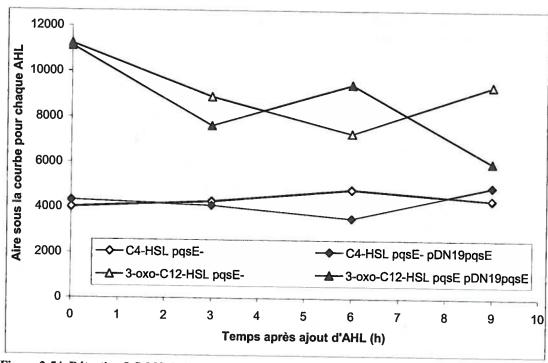


Figure 3-54. Détection LC-MS de la dégradation des AHL en présence de PqsE.

3.3.4.3 Analyse comparative de la production et de la dégradation des AHL chez la souche sauvage et le mutant pqsE⁻ par LC/MS

Les cinétiques de production et de dégradation des auto-inducteurs des systèmes Las et Rhl, respectivement le 3-oxo-C₁₂-HSL et le C₄-HSL, ont été suivies par LC/MS. Le laboratoire de spectrométrie de masse du Dr. François Lépine a élaboré un protocole de suivi des AHL intactes ou hydrolysées par LC/MS (non publié). Celui-ci a été utilisé pour le suivi de la production et de la dégradation de ces molécules dans le surnageant de la souche sauvage et du mutant *pqsE*. Pour chaque point d'échantillonnage, 2 ml des cultures bactériennes de PA14 et de *pqsE* ont été centrifugés. Le surnageant a ensuite été injecté dans le LC-MS pour analyse. Les résultats obtenus (Figure 3-55) ont clairement montré que la production et la dégradation des AHL chez *P. aeruginosa* sont essentiellement similaires entre la souche sauvage et le mutant *pqsE*. PqsE n'agit donc pas sur ces auto-inducteurs.

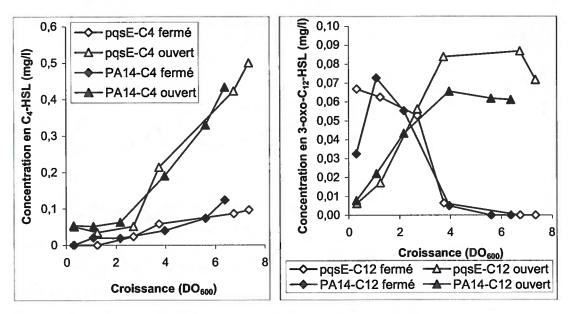


Figure 3-55. Analyse par LC-MS de la cinétique de production et de dégradation des AHL principaux de *P. aeruginosa* dans PA14 et son mutant *pqsE*.

3.3.5 Lien entre PqsE et les régulateurs du quorum sensing

Malgré ses homologies avec une hydrolase dépendante du zinc, aucune petite molécule pouvant agir comme substrat de PqsE n'a pu être détectée. Les différentes molécules-signal connues produites par *P. aeruginosa* et essentielles aux systèmes de QS ont toutes été étudiées spécifiquement sans pouvoir observer aucun effet de cette enzyme putative sur celles-ci. Des analyses plus globales, permettant de comparer la totalité des molécules intra- et extracellulaires présentes chez la souche sauvage PA14 et chez le mutant *pqsE* par LC-MS, n'ont mené à la découverte d'aucun substrat pour PqsE non plus.

Puisque PqsE agit sur de nombreux gènes contrôlés par le QS mais qu'il n'influence pas la production des molécules-signal, il reste à vérifier s'il ne peut pas affecter directement l'un des régulateurs du QS.

3.3.5.1 PqsE et RhIR agissent-il sur la même voie de régulation de la pyocyanine ?

Le lien qui unit PqsE et RhlR reste encore à ce jour énigmatique. Comme expliqué précédemment (voir section 3.3.2.2.1.1 p219) ainsi que par d'autres publications (Déziel

et al., 2005; Diggle et al., 2003), il existe un chevauchement entre les gènes régulés par RhlR et ceux régulés par le système MvfR-PQS via PqsE. PqsE et RhlR agissent-il dans une même voie de régulation ou empruntent-ils un parcours indépendant l'un de l'autre? L'un peut-il fonctionner en absence de l'autre? Puisqu'un mutant pqsE exprime RhlR, et qu'inversement un mutant rhlR (sur)exprime PqsE, mon hypothèse est que les deux doivent être réunis pour activer leur régulon. Il faudrait donc vérifier expérimentalement si l'un des facteurs régulés par ces deux enzymes, soit la pyocyanine par exemple, requiert bien la présence de ces deux gènes pour être activé.

3.3.5.1.1 Expression de la pyocyanine dans un mutant lasR exprimant pqsE et /ou rhlR

Afin d'éviter les obstacles rencontrés lors de l'utilisation d'un système hétérologue, j'ai décidé de choisir l'alternative d'un mutant de *P. aeruginosa* qui n'exprimerait ni PqsE ni RhlR. Le régulateur LasR contrôle l'expression de *rhlR* (voir Figure 1-3 p. 17), ainsi que celle de *pqsE via* son contrôle sur *mvfR* (Wade *et al.*, 2005). Le mutant *lasR* devrait donc n'exprimer aucun de ces deux gènes, du moins avant le début de la phase stationnaire (Dekimpe & Déziel, 2009). Il ne produit d'ailleurs pas de pyocyanine avant ce stade. Donc, si on exprime soit *pqsE*, soit *rhlR*, soit les deux de manière constitutive chez un mutant *lasR* et qu'on évalue l'apparition de la pyocyanine, on devrait être en mesure de confirmer que cette dernière dépend bien de ces deux enzymes. On s'attend donc à trouver une production précoce de pyocyanine en présence des deux gènes exprimés constitutivement, et aucune production de pyocyanine avancée en absence de l'un d'eux seulement.

Comme attendu, la souche produisant le plus de pyocyanine est celle qui exprime de façon constitutive pqsE et rhlR (Figure 3-56A). La production du pigment est même devancée. En effet, elle commence à être produite par la souche sauvage vers une DO_{600} de 2,5-3 dans le milieu TSB, tandis qu'elle est déjà présente à une DO_{600} de 1 lors de la surexpression de rhlR et de pqsE (Figure 3-56B).

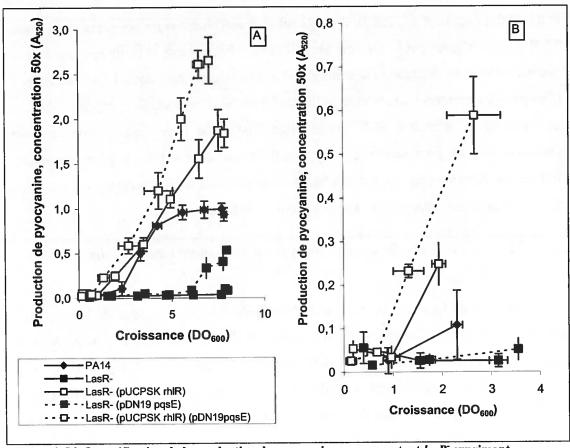


Figure 3-56. Quantification de la production de pyocyanine par un mutant *lasR* exprimant constitutivement *pqsE* et /ou *rhlR* durant (A) toute la croissance bactérienne et (B) durant le début de la phase exponentielle.

Un mutant *lasR* ne produit pas de pyocyanine avant la fin de la phase stationnaire. Lors de la surexpression de *pqsE*, la pyocyanine est produite un peu plus tôt (DO₆₀₀ de 6), mais nettement après la souche sauvage (DO₆₀₀ de 2,5). Ceci est probablement dû à l'absence de *rhlR*, qui n'est exprimée chez le mutant *lasR* qu'à cette DO₆₀₀ (Dekimpe & Déziel, 2009). Par contre, surexprimer *rhlR* semble suffire pour produire de la pyocyanine plus précocement et en plus grande quantité que chez la souche sauvage. Cette observation mène à deux hypothèses possibles : [1] *pqsE* n'est pas nécessaire en début de croissance dans un mutant *lasR* pour générer de la pyocyanine, ou [2] *pqsE* est exprimé suffisamment tôt dans ce mutant pour produire ce pigment. Malgré le fait que *mvfR* soit connu pour être contrôlé par LasR (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006b), on sait également que le mutant *lasR* produit de grandes quantités de HHQ (D'Argenio *et al.*, 2007; Déziel *et al.*, 2004) et de PQS (Diggle

et al., 2003), ce qui démontre que l'opéron pqsABCDE est transcrit. Ainsi, la seconde hypothèse selon laquelle pqsE est présent dans ce mutant a été privilégiée.

3.3.5.1.2 Un mutant lasR produit de la pyocyanine en absence de PqsE

Afin de vérifier qu'en absence de *pqsE* aucune production de pyocyanine n'est possible, même en surexprimant *rhlR*, chez le mutant *lasR*, j'ai bloqué la transcription de l'opéron *pqsABCDE* avec un inhibiteur, le 6-FABA (voir section 2.3.2.2, p. 80). Cet inhibiteur bloque la synthèse des HAQ, dont le HHQ et le PQS qui sont des ligands de MvfR. Puisque ce régulateur est privé de ses ligands, la transcription de l'opéron *pqsABCDE* que MvfR active directement est compromise. Je m'assure ainsi que *pqsE* n'est pas exprimé dans la souche *lasR* supplémenté de 6-FABA, à moins de l'exprimer en *trans* de manière constitutive. Je peux donc répéter l'expérience présentée ci-dessus. La Figure 3-57 montre que le 6-FABA a complètement inhibé la production de pyocyanine chez la souche sauvage, mais pas chez les souches *lasR* surexprimant *rhlR*, et ce même lorsque l'expression de *pqsE* est inhibée par le 6-FABA. Ce résultat suggère que le mutant *lasR* est capable de produire de la pyocyanine en absence *pqsE*.

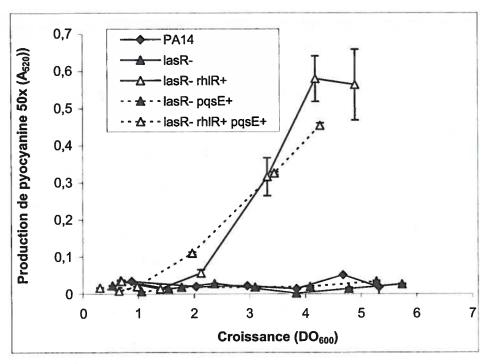


Figure 3-57. Quantification de la pyocyanine en présence de 3 mM de 6-FABA dans différentes souches.

rhlR+: vecteur pUCPSKrhlR; pqsE+: vecteur pDN19pqsE.

A ce point de mes travaux, aucune souche dérivée de *P. aeruginosa* PA14 n'était capable de produire de la pyocyanine en absence de PqsE. L'hypothèse proposée ici était donc audacieuse et méritait d'être vérifiée avec minutie. Pour confirmer que PqsE n'est pas nécessaire pour produire de la pyocyanine dans un mutant *lasR* exprimant *rhlR*, un double mutant *lasR* pqsE a été généré. Ce double mutant ne produit pas de pyocyanine, même lors de la phase stationnaire de croissance, ce qui le différencie du simple mutant *lasR* (Dekimpe & Déziel, 2009). Exprimer constitutivement *rhlR* dans cette souche résulte en une production de pyocyanine (Figure 3-58A). Ceci démontre que PqsE n'est pas nécessaire pour activer la production de pyocyanine dans un mutant *lasR*.

Pour confirmer hors de tout doute cette découverte, l'ADN du double mutant exprimant *rhlR* et produisant de la pyocyanine a été extrait et amplifié par PCR. Des amorces amplifiant le gène *pqsE* ont été utilisées pour confirmer la délétion dans ce gène. La Figure 3-58B démontre la délétion dans le gène *pqsE* pour le double mutant.

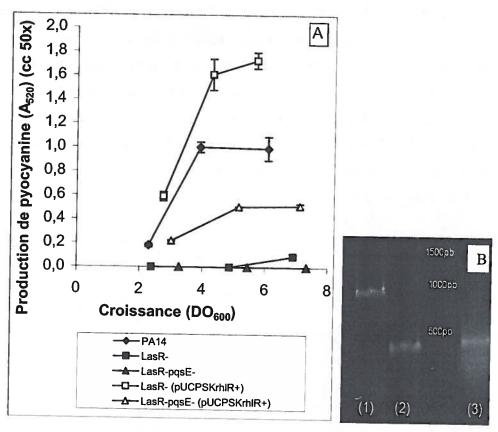


Figure 3-58. (A) Quantification de la production de pyocyanine par spectrophotométrie dans un double mutant las R'pas E' (pUCPSKrhlR). (B) Amplification PCR du gène pas E. (1) PA14. (2) Mutant pas E'. (3) Double mutant las R'pas E' exprimant rhlR et produisant de la pyocyanine.

Ces diverses expériences mènent à la conclusion que RhlR peut réguler la production de pyocyanine en absence de PqsE dans certaines conditions telles que celles rencontrées dans un mutant *lasR*⁻. PqsE n'est donc pas strictement nécessaire pour la production de pyocyanine. Par contre, mes résultats suggèrent que PqsE ne peut quant à elle agir en absence de RhlR, puisque sa surexpression n'induit pas la production de pyocyanine dans le mutant *lasR*⁻ lorsque RhlR n'est pas exprimé. Cela appuie l'hypothèse que RhlR intervient dans la voie de régulation de PqsE sur la biosynthèse de la pyocyanine.

3.3.5.1.3 Un mutant pqsE surexprimant rhlR ne produit pas de pyocyanine, et vice versa

Puisqu'une surexpression de rhlR suffit à restaurer la production de pyocyanine dans un mutant lasR en absence de pqsE, il serait intéressant d'étudier l'effet de cette

surexpression dans d'autres souches. La Figure 3-59A montre que surexprimer rhlR chez le mutant pqsE induit peu de production de pyocyanine, alors que cette production était beaucoup plus élevée chez le mutant lasR (Figure 3-56). Afin de confirmer également que l'absence de pyocyanine chez le mutant rhlR n'est pas due à une absence de pqsE, ce dernier a été surexprimé dans cette souche, mais cela n'a pas généré de pyocyanine non plus (Figure 3-59B). Ces résultats confirment que RhlR et PqsE sont tous les deux nécessaires pour activer la production significative de pyocyanine, hormis chez le mutant lasR où PqsE n'est plus important.

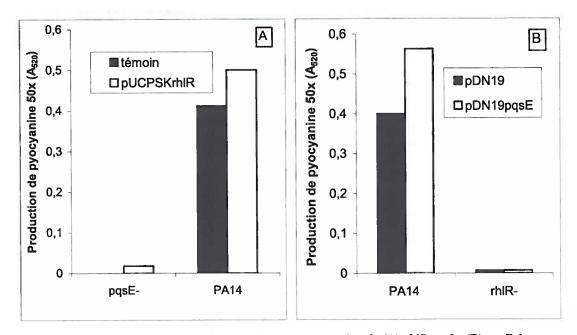


Figure 3-59. Production de pyocyanine lors d'une surexpression de (A) rhlR ou de (B) pqsE dans différentes souches après 9 heures de culture.

3.3.5.1.4 Lien entre le C₄-HSL et le rôle de PqsE

Le système Rhl est essentiel pour induire la production de pyocyanine dans *P. aeruginosa*. Le rôle primordial de RhlR a été démontré dans les expériences précédentes. Ce régulateur nécessite la présence de son auto-inducteur, le C₄-HSL, pour être actif. Bien que PqsE n'agisse pas directement sur cet auto-inducteur, qu'en est-il du rôle du C₄-HSL dans l'activation de la pyocyanine en présence ou en absence de cette enzyme ? Pour le vérifier, différentes concentrations de C₄-HSL ont été ajoutées chez les mutants

lasR⁻ et lasR⁻pqsE (le C₄-HSL est produit seulement en fin de phase stationnaire dans ce mutant, lorsque RhlR est exprimé, voir Figure 1-4 p. 19). Le C₄-HSL induit la production de pyocyanine chez le mutant lasR⁻. Cette induction n'a toutefois pas lieu chez le mutant lasR⁻pqsE (Figure 3-60A). Pour confirmer ce résultat intriguant, j'ai surexprimé rhlI dans ces deux mutants et j'ai comparé la production de pyocyanine dans ces nouvelles souches et dans celles exprimant rhlR. La Figure 3-60B montre également que rhlI surexprimé induit la pyocyanine dans lasR⁻ mais pas du tout dans lasR⁻pqsE. L'induction reste toutefois beaucoup plus limitée que celle observée lors de la surexpression de rhlR. Ces résultats suggèrent que PqsE permet une meilleure activation de la production de la pyocyanine par le C₄-HSL.

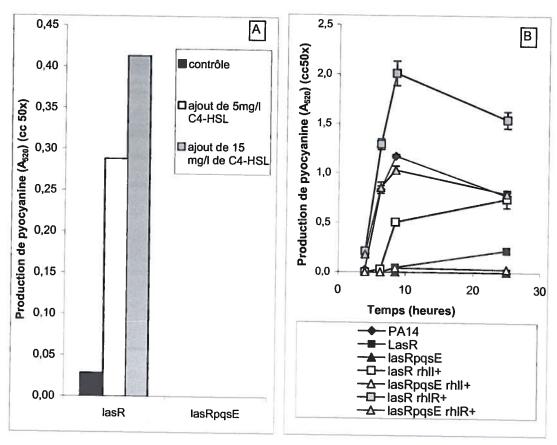


Figure 3-60. Analyse par spectrophotométrie de la pyocyanine chez les mutants las R et las R pqs E (A) ajout de C₄-HSL, échantillonnage à une DO de 6; (B) surexpression de rhll (pUCPSKrhll) ou de rhlR (pUCPSKrhlR) et cinétique de production de pyocyanine.

La production de pyocyanine en présence de C₄-HSL chez le mutant *lasR* est induite plus tardivement que chez la souche sauvage. Étant donné les résultats précédents,

il semble que PqsE soit nécessaire pour observer l'effet d'un ajout de C₄-HSL sur la production de pyocyanine. Il est donc probable que l'apparition plus tardive de la pyocyanine dans $lasR^-$ en présence de C₄-HSL soit due à l'expression plus tardive de pqsE dans ce mutant. Pour le confirmer, j'ai exprimé constitutivement pqsE chez le mutant $lasR^-$, en présence ou en absence de C₄-HSL. En présence de pqsE et de C₄-HSL, la production de pyocyanine est plus fortement avancée qu'en présence de l'un ou l'autre ajouté séparément. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le C₄-HSL est plus efficace pour activer la production pyocyanine lorsque PqsE est présente.

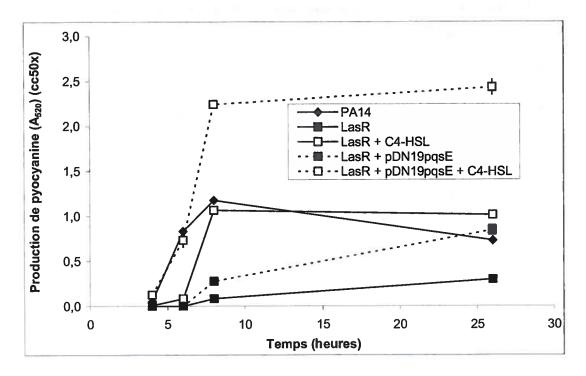


Figure 3-61. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine en présence de pqsE et /ou de 5 mg/l de C₄-HSL.

J'ai voulu confirmer ces résultats en répétant l'expérience chez la souche PA14. Un résultat similaire s'observe en début de croissance, avec une production de pyocyanine avancée en présence de *pqsE* et de C₄-HSL (Figure 3-62B). Par contre, cette différence s'amenuise et disparaît en début de phase stationnaire (Figure 3-62A). Ces résultats suggèrent qu'il existe des facteurs de répression de la pyocyanine présents chez la souche sauvage et absents chez le mutant *lasR*.

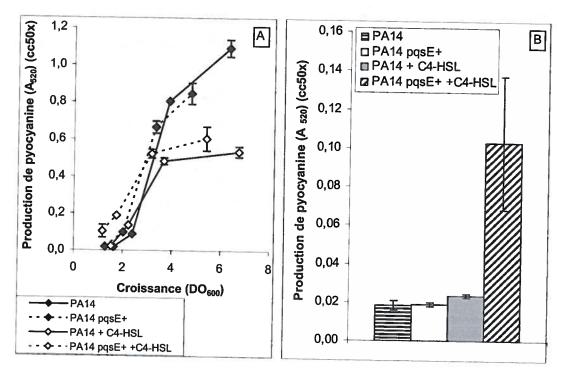


Figure 3-62. Production de pyocyanine dans PA14 en présence de pqsE et/ou de 5 mg/l de C₄-HSL. (A) Cinétique de production ; (B) Production en début de phase exponentielle (DO₆₀₀ = 1,5). C4 = C₄-HSL ; pqsE+ : vecteur d'expression pDN19pqsE.

3.3.5.2 PqsE réprime un facteur de répression du quorum sensing

L'hypothèse proposée est que PqsE agisse sur un facteur qui bloque RhlR. La présence de ce facteur nécessite LasR. Il serait donc absent chez le mutant *lasR*, ce qui expliquerait que PqsE ne soit plus nécessaire dans cette souche. Ainsi, le rôle de PqsE serait de réprimer un facteur réprimant RhlR et contrôlé par LasR. Cette hypothèse est en accord avec le chevauchement partiel des régulons des systèmes Rhl et MvfR/PQS/PqsE. En effet, le facteur de répression sur lequel agit PqsE peut affecter d'autres cibles en plus de RhlR. L'étape suivante est d'identifier ce facteur de répression contrôlé par LasR.

3.3.5.2.1 QscR n'est pas le répresseur bloqué par PqsE

QscR est un répresseur du QS, appartenant à la famille des régulateurs de type LuxR et connu pour réprimer RhlR et LasR en créant avec eux des hétérodimères (Chugani et al., 2001; Ledgham et al., 2003b). Le mutant qscR surproduit par ailleurs la pyocyanine. QscR n'est pas contrôlé par LasR (Ledgham et al., 2003b), mais en absence de celui-ci, une plus grande quantité de protéines QscR est disponible pour réprimer

RhIR. Si davantage de QscR sont exprimés dans une souche par rapport à RhIR, il y aura répression, à moins que PqsE ne vienne empêcher QscR d'agir. Selon cette hypothèse, un double mutant $pqsE^-qscR^-$ devrait produire de la pyocyanine. Ceci a été vérifié par la construction d'un simple mutant $qscR^-$ et d'un double mutant $qscR^-pqsE$, et par le suivi de la production de pyocyanine chez ces souches. La Figure 3-63 montre que le simple mutant produit davantage de pyocyanine que la souche sauvage, tel qu'attendu (Chugani et al., 2001). Par contre, le double mutant ne produit pas de pyocyanine. J'ai également exprimé constitutivement rhlR (avec pUCPSKrhlR) dans le double mutant, mais cela n'a pas restauré la production de ce pigment. QscR n'est donc pas le répresseur bloqué par PqsE.

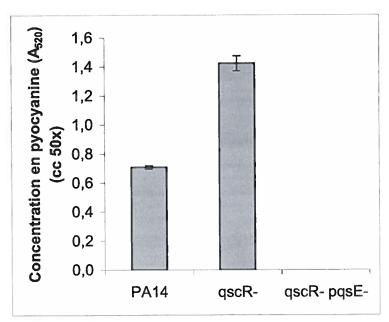


Figure 3-63. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine chez les mutants qscR, à une $DO_{600} = 5$.

3.3.5.2.2 Étude du répresseur RsaL

3.3.5.2.2.1 Un double mutant $rsaL^{-}pqsE^{-}$ produit de la pyocyanine

RsaL est également un répresseur du QS. Il est activé par LasR et réprime directement le gène *lasI*, ainsi que les gènes de biosynthèse des phénazines (de Kievit *et al.*, 1999; Rampioni *et al.*, 2007). Un mutant *rsaL* produit donc de grandes quantités de 3-oxo-C₁₂-HSL et de pyocyanine. Deux doubles mutants *pqsE rsaL* ont été obtenus du

laboratoire de la Dre Laurence G. Rahme. L'un possède une mutation à l'intérieur de $rsaL^-$ (G33), tandis que l'autre est muté au niveau de son promoteur (G49). Pour confirmer l'identité de ces deux mutants, la production de 3-oxo-C₁₂-HSL a été suivie. La Figure 3-64 montre que le mutant G33 produit des quantités de 3-oxo-C₁₂-HSL similaires au mutant $rsaL^-$, tandis que le mutant G49 ne surproduit pas cette molécule-signal. La mutation du mutant G49 dans le promoteur du gène rsaL affecte donc également le gène lasI, situé à côté. Les analyses seront donc effectuées avec le mutant G33 uniquement.

La pyocyanine a été quantifiée dans le simple et le double mutant. Comme attendu, le mutant $rsaL^-$ surproduit la pyocyanine (Figure 3-64). Ce n'est pas le cas du double mutant, qui en produit drastiquement moins. Néanmoins, la présence de cette faible quantité de pyocyanine en absence de pqsE est inattendue, puisqu'elle suggère à nouveau que la pyocyanine peut être produite en absence de ce gène.

Puisque le double mutant G33 parvient à produire un peu de pyocyanine, j'ai mesuré sa production dans le milieu King A, connu pour favoriser la production de pyocyanine. Dans ce milieu supplémenté de 100 µM de fer, le double mutant rsaL pqsE produit autant de pyocyanine que la souche sauvage, mais moins que le simple mutant rsaL (Figure 3-64C).

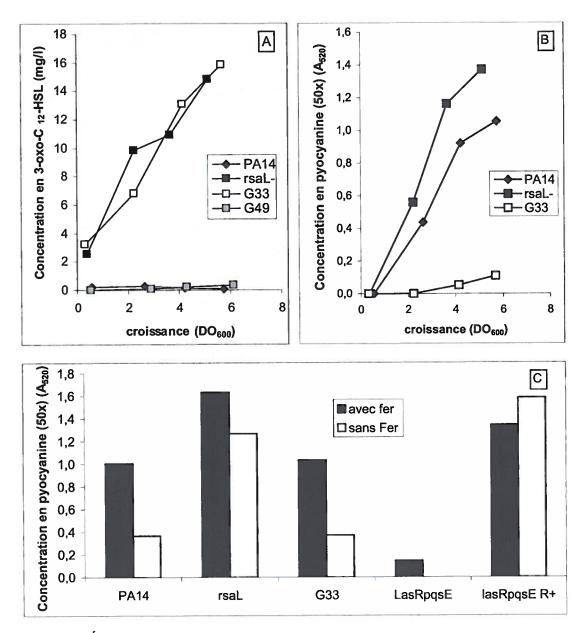


Figure 3-64. Étude de rsaL. (A) Analyse LC-MS de la production de 3-oxo- C_{12} -HSL dans les doubles mutants $rsaL^*pqsE$. (B) production de pyocyanine chez les mutants $rsaL^*$ et G33 en milieu TSB. (C) Production de pyocyanine dans différents mutants en milieu King A contenant ou non 100 μ M de fer. R+ = pUCPSKrhlR.

La pleine production de pyocyanine par le double mutant *lasR pqsE* nécessite que *rhlR* soit exprimé constitutivement (Figure 3-56 p. 270 et Figure 3-64). Cependant, il ne devrait pas être nécessaire d'exprimer *rhlR* en *trans* chez le mutant G33 puisque la transcription de ce régulateur n'est pas contrôlée par RsaL (Rampioni *et al.*, 2007). Toutefois, il reste intéressant de vérifier si l'expression constitutive de *rhlR* dans le

double mutant ne mène pas à une augmentation de la production de pyocyanine, par exemple dans l'éventualité où RsaL aurait un effet post-transcriptionnel sur RhlR. Ainsi, le vecteur pUCPSKrhlR a été transféré chez le mutant G33 et la production de pyocyanine a été comparée entre les doubles mutants surexprimant rhlR. La Figure 3-65 montre que le double mutant G33 produit trois fois moins de pyocyanine que le double mutant lasR*pqsE*, malgré la surexpression de rhlR. Ce résultat suggère que le facteur répresseur hypothétique sur lequel agirait PqsE est plus abondant dans un mutant rsaL*que dans un mutant lasR*. Ceci va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle le répresseur ciblé par PqsE est RsaL.

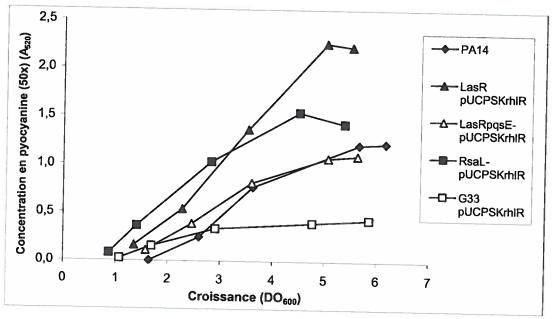


Figure 3-65. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine dans plusieurs souches exprimant constitutivement *rhlR* (pUCPSK*rhlR*), en milieu TSB.

Puisque l'hypothèse est que LasR active le répresseur sur lequel PqsE pourrait agir, surexprimer LasR devrait augmenter la production de répresseur et donc diminuer la production de pyocyanine chez la souche sauvage PA14. Si ce répresseur est RsaL, et qu'on surexprime *lasR* chez le mutant G33, on ne devrait pas observer une diminution de la pyocyanine. Nous avons au laboratoire deux vecteurs exprimant *lasR* de manière constitutive : pUCPSK*lasR* et pMT1. Ces vecteurs ont été exprimés chez le mutant G33 séparément. Ils y ont généré une réponse opposée. Le vecteur pUCPSK*lasR* a diminué la

production de pyocyanine, comme attendu d'après notre hypothèse, mais pMT1 l'a augmentée. La réponse a été identique chez le mutant *lasR*⁻ également. Cette expérience ne me permet donc pas de déterminer clairement si RsaL est le répresseur bloqué par PqsE.

3.3.5.2.2.2 PqsE est encore fonctionnelle en absence de RsaL

Outre la production de pyocyanine, il existe d'autres facteurs contrôlés par PqsE. Comme présenté au point 3.3.3.3.2 p261, surexprimer PqsE induit une diminution de production du HHQ. Le fait-il également en bloquant un répresseur ? Celui-ci est-il RsaL ? J'ai étudié la production de HHQ et de PQS dans les souches PA14 et rsaL exprimant ou non pqsE constitutivement sur un plasmide. J'ai également suivi leur production chez le mutant lasR, dans lequel le répresseur serait absent. L'analyse de la somme du HHQ et du PQS est importante, car LasR et RsaL influencent l'expression de PqsH, qui convertit le HHQ en PQS. Pour obtenir la totalité du HHQ produit par la bactérie, il me faut donc combiner la concentration de HHQ avec celle du HHQ converti en PQS.

Si PqsE dégrade un répresseur hypothétique qui active la production de HHQ, on s'attend à observer une diminution de la production de HHQ lorsque PqsE est surexprimé. C'est en effet le cas chez la souche sauvage (Figure 3-66). Puisque ce répresseur hypothétique est sous le contrôle de LasR, cette diminution devrait être absente chez un mutant $lasR^-$, ce qui a également été observé (Figure 3-66). Chez le mutant $rsaL^-$, on observe une nette diminution également, supérieure même à celle observée chez la souche sauvage. Ces résultats confirment que PqsE n'a pas d'effet dans un mutant $lasR^-$ mais qu'il en a dans un mutant $rsaL^-$. Cela suggère que RsaL n'est pas le répresseur sur lequel il agirait. Cela indique également que PqsE agit sur la régulation des HAQ via ce même répresseur hypothétique contrôlé par LasR.

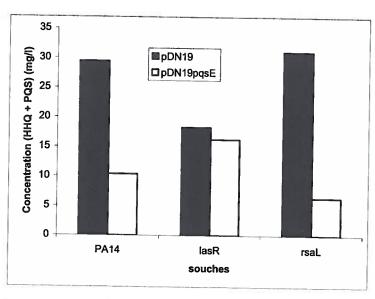


Figure 3-66. Analyse LC-MS de la production de (HHQ+PQS) dans différents mutants exprimant ou non pqsE (pDN19pqsE) (DO₆₀₀=5).

3.3.5.2.3 Le répresseur est exprimé tard dans un mutant las R

Comment expliquer que la souche *lasR*⁻ (pUCPSK*rhlR*) produise davantage de pyocyanine que le double mutant *lasR*⁻pqsE (pUCPSK*rhlR*) (voir Figure 3-65)? Mon hypothèse est que le répresseur sur lequel agit PqsE pourrait quand même être exprimé, mais tardivement, chez le mutant *lasR*⁻, tout comme le sont de nombreux autres gènes (Dekimpe & Déziel, 2009). Ainsi, lorsque le répresseur est exprimé en fin de phase stationnaire, le double mutant devient incapable de produire de la pyocyanine, tandis que chez le simple mutant *lasR*⁻, PqsE peut venir réprimer ce répresseur. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai quantifié la pyocyanine produite par ces deux souches une fois le répresseur exprimé, dans le milieu King A. Le culot du simple et du double mutant a été récolté à une DO₆₀₀ de 5 environ (lorsque le mutant *lasR*⁻ commence à faire de la pyocyanine), lavé puis resuspendu dans le surnageant d'un mutant *lasR*⁻pqsE⁻, qui ne contient pas de pyocyanine, et ce pour éviter de quantifier de la pyocyanine ayant été produite avant que le répresseur ne soit présent. Les souches ont été incubées ainsi 4 h et la production de pyocyanine a ensuite été quantifiée. Les souches possédant PqsE ont produit nettement plus de pyocyanine, ce qui suggère que le répresseur est bien présent en

fin de croissance dans les souches *lasR*⁻ et que PqsE le dégrade à ce moment-là (Figure 3-67).

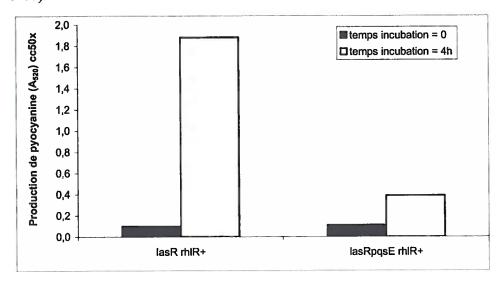


Figure 3-67. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine en fin de croissance dans les mutant lasR (pUCPSKrhlR) et lasR pqsE (pUCPSKrhlR).

3.3.5.2.4 Les mutants las let rhl le produisent aussi de la pyocyanine lorsqu'ils expriment rhl le expriment

Si l'expression du répresseur que je cherche dépend du système LasI/LasR, il est plausible qu'un mutant *lasI* réagisse de la même manière que le mutant *lasI* lorsque j'y exprime *rhlR* constitutivement. J'ai intégré le vecteur pUCPSK*rhlR* chez le mutant *lasI* afin de vérifier cette hypothèse.

Tel qu'attendu, un mutant *lasI* ne commence à produire de la pyocyanine qu'en fin de croissance, tandis que lorsqu'il exprime *rhlR* constitutivement, elle apparaît nettement plus tôt (Figure 3-68). Ce mutant réagit donc de la même manière que le mutant *lasR*, bien qu'il ne produise que le tiers de la quantité observée dans ce dernier.

RhIR est essentiel pour produire la pyocyanine. Ce régulateur nécessite la présence de son auto-inducteur, le C₄-HSL, pour être activé. Ceci suggère que la synthase de C₄-HSL soit tout aussi essentielle pour activer l'expression de la pyocyanine. Pour le vérifier, j'ai suivi la production de ce pigment chez le mutant *rhII* exprimant ou non *rhIR* de manière constitutive. Il est surprenant de constater que *P. aeruginosa* peut produire de la pyocyanine lorsqu'elle surexprime *rhIR* en absence de C₄-HSL (Figure 3-68). Ces

résultats confirment que les AHL ne sont pas directement essentielles à la production de pyocyanine, bien qu'elles interviennent dans sa régulation.

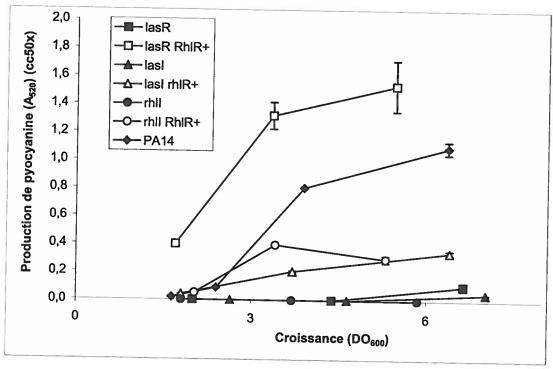


Figure 3-68. Analyse par spectrophotométrie de la production de pyocyanine chez les mutants lasR, lasI et rhlI exprimant rhlR (pUCPSKrhlR).

3.3.5.3 Identification du facteur de répression bloqué par PqsE par mutagenèse aléatoire

De nombreux autres régulateurs du QS pourraient encore être étudiés dans l'optique d'identifier celui qui aurait un lien avec PqsE. Pour cribler de manière plus exhaustive tous les candidats potentiels, il était cependant intéressant de mettre au point une méthode plus générale. Selon mon hypothèse, une mutation dans le répresseur recherché mènera à une production de pyocyanine dans un mutant pqsE. Cela signifie que dans cette souche, les gènes phzA1-G1 de biosynthèse des phénazines seront activés.

J'ai construit un rapporteur transcriptionnel chromosomique pour suivre la transcription des gènes *phzA1-G1* chez le mutant *pqsE*. Le vecteur mini-CTX-*lacZ* (Becher & Schweizer, 2000) est un outil spécialement créé dans le but de générer des fusions transcriptionnelles avec le gène de la β-galactosidase. Le rapporteur *phzA1-lacZ* a

été intégré dans le chromosome du mutant pqsE, dans lequel le promoteur phzA1 n'est pas activé. La souche présente donc un phénotype de colonie blanche en présence de X-gal.

Afin de confirmer que le phénotype bleu-blanc permet de différencier les souches exprimant les gènes *phz* de celles qui ne les expriment pas, j'ai réalisé la même construction chez la souche sauvage PA14. Les conditions de culture ont été optimisées pour maximiser le contraste bleu/blanc entre ces deux souches (voir la section matériel et méthodes).

Le mutant pqsE::phzA1-lacZ a subi une mutagenèse aléatoire avec un transposon. Lors de la mutagenèse, si un transposon s'insère dans le répresseur recherché, l'expression de phzA1-lacZ sera rétablie et le mutant présentera un phénotype de colonie bleue sur X-gal.

Près de 36 000 colonies ont été criblées. Sur celles-ci, 27 ont présenté un phénotype de colonie plus bleue. Ces 27 mutants ont été cultivés en milieu liquide afin d'observer la production de pyocyanine. Cependant, aucun de ceux-ci n'en a produit. L'activité β-galactosidase a été réalisée sur 11 d'entre eux. La Figure 3-69 montre que deux de ces mutants présentent une réelle augmentation de l'expression des gènes *phzA1-G1* par rapport au mutant *pqsE*::*phzA1-lacZ*, malgré le fait qu'ils ne produisent pas de pyocyanine visible.

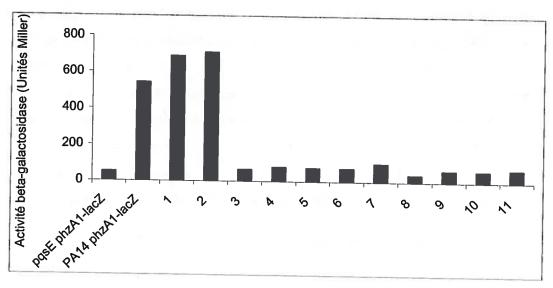


Figure 3-69. Activité beta-galactosidase dans les colonies bleutées des mutants pqsE::phzA1-lacZ ISphoA.

Les colonnes numérotées de 1 à 11 représentent les mutants pqsE::phzA1-lacZ::ISphoA sélectionnés lors du criblage.

Pour connaître le lieu d'insertion du transposon au sein du chromosome de pqsE::phzA1-lacZ, une partie du transposon et de la région chromosomique où il s'est inséré a été séquencée. Celui-ci s'est inséré directement dans le promoteur du gène phzA1. Étant donné qu'aucune production de pyocyanine n'est visible malgré une forte activité β -galactosidase, c'est probablement au sein même de la construction phzA1-lacZ que le promoteur s'est intégré.

La forte augmentation de la transcription de *phzA1-lacZ* peut être due à deux raisons : [1] soit le transposon s'est inséré dans une région reconnue par le répresseur que je cherche : celui-ci n'étant plus capable de réprimer ce gène, on observe une meilleure transcription; [2] soit le transposon possède lui-même des promoteurs qui ont pu augmenter la transcription du gène *phzA1*. Pour le vérifier, le transposon IS*phoA* a été excisé du chromosome des colonies *pqsE::phzA1-lacZ::*IS*phoA* au moyen de la recombinase Cre (voir section.3.2.11.5.2 p. 195). Toutes les colonies devenues sensibles à la tétracycline et donc ayant perdu le reste du transposon ont toutes perdu leur activité β-galactosidase, ce qui confirme que l'activation de la transcription des gènes *phz* était due aux promoteurs présents sur le transposon.

En conclusion, sur les 36 000 colonies criblées, aucun mutant aléatoire généré chez la souche pqsE::phzA1-lacZ n'a permis d'obtenir une production de pyocyanine. Cette constatation mène à trois hypothèses possibles : [1] soit le facteur de répression ne nécessite la présence d'aucun gène pour être exprimé, ce qui est improbable; [2] soit les voies de répression et d'activation de la pyocyanine se chevauchent, ce qui ne permet pas d'en inactiver une tout en conservant l'autre intacte ; [3] soit le facteur est codé par une séquence trop courte pour être ciblée par une mutagenèse générant 36 000 mutants. Pour plusieurs raisons citées plus bas, c'est cette dernière hypothèse qui a été approfondie.

3.3.6 Lien entre PqsE et les ARNnc

Les connaissances acquises jusqu'à présent me permettent d'établir une liste des propriétés du substrat de PqsE. Celui-ci devrait être probablement petit et hydrolysable si l'on considère que PqsE appartient à la famille des hydrolases. Il ne peut toutefois pas être une petite molécule détectable par LC-MS puisqu'aucun substrat n'a été découvert avec cette méthode. Il doit être soit non protéique soit être codé sur une très petite séquence, puisqu'il n'a pas été identifié lors de la mutagenèse aléatoire et que les gels bidimensionnels n'ont pas permis de l'identifier. Ce substrat devrait avoir un rôle de répresseur contrôlé par LasR puisqu'un double mutant lasRpasE surexprimant rhlR produit de la pyocyanine. Il doit également être impliqué dans le QS, puisque PqsE affecte principalement les gènes contrôlés par ce système. Enfin, le substrat transformé par PqsE doit être intracellulaire, puisqu'aucun surnageant et aucune molécule exogène testée n'a permis de complémenter le mutant pqsE.

Une seule catégorie de molécules correspond à tous ces critères réunis. Les ARNnc sont des acteurs essentiels de la régulation de l'expression génétique dans tous les organismes vivants. Ils sont petits, intracellulaires, sont dégradés par certaines RNases de la famille des hydrolases, peuvent agir comme des répresseurs et sont également impliqués dans le QS. Il serait donc très probable que la cible de PqsE soit un petit ARN régulateur.

3.3.6.1 Mutagenèse aléatoire et criblage sur près de 350 000 colonies

La méthode de criblage décrite plus haut est une méthode qui devrait permettre d'identifier ce petit ARN régulateur, à condition que le criblage se fasse sur un nombre nettement plus élevé de mutants.

Malgré l'optimisation des paramètres de criblage avec la construction mini-CTXphzA1-lacZ, le criblage à la recherche de colonies exprimant plus fortement les gènes phz était compliqué par la forte activité basale du rapporteur («bruit de fond»). Pour pallier cet obstacle, un nouveau rapporteur a été utilisé. Le vecteur pCDS101 (Sibley et al., 2008) est un mini-CTX-phzA1-lux modifié pour éliminer la transcription résiduelle du gène lux. La construction a été intégrée dans le chromosome des souches PA14 et pqsE pour vérifier que les contrastes d'expression du gène phzA1-lux en absence ou en présence de PqsE étaient suffisamment visibles pour réaliser le criblage. La Figure 3-70 montre que les colonies exprimant les gènes phz se distinguent très aisément des autres colonies dans l'obscurité. Pour générer cette photo, les souches PA14::phzA1-lux et pqsE-::phzA1-lux ont été mélangées pour un ratio de 4/96 afin de vérifier l'expression du rapporteur phzA1-lux. Sur les 107 colonies présentes sur la gélose, 2 présentent une luminescence nettement supérieure aux autres. En culture liquide, ces deux colonies ont été les seules qui ont produit de la pyocyanine, ce qui confirme l'efficacité de la méthode. Celle-ci sera donc utilisée pour identifier l'ARN régulateur potentiel sur lequel PqsE agirait.



Figure 3-70. Détection des souches exprimant le rapporteur phzA1-lux chez pqsE et PA14. Un ratio de 96 bactéries pqsE phzA1-lux pour 4 bactéries PA14 phzA1-lux a été utilisé pour valider la méthode de criblage. Photographie prise avec un temps d'exposition de 3 min.

Une nouvelle mutagenèse aléatoire a donc été réalisée avec la souche pqsE::phzA1-lux. Puisque les petits ARN ont une taille d'environ 100 nucléotides, c'est-à-dire environ dix fois plus petite que celle des gènes, il est nécessaire d'étendre le criblage sur un nombre nettement plus élevé de colonies. Près de 350 000 colonies ont été criblées par la stagiaire Natacha Laprade, à la recherche de mutants capables d'activer la transcription des gènes phzA1-G1 en absence de PqsE. Quelques mutants plus lumineux ont été sélectionnés mais aucun n'a produit de pyocyanine en milieu liquide. Ce criblage à grande échelle n'a donc pas suffi pour identifier un gène codant pour une cible de PqsE.

3.3.6.2 Recherche d'un ARN régulateur cible de PqsE par bioinformatique

La faiblesse de la méthode de mutagenèse aléatoire réside dans le fait qu'il existe des « points chauds » qui favorisent l'insertion du transposon dans certaines régions du génome, tandis que d'autres régions ne seront jamais atteintes par ceux-ci. A la recherche d'une alternative pour identifier l'ARN régulateur putatif, l'approche bioinformatique a été considérée.

La protéine PqsE possède des homologues chez plusieurs espèces de *Burkholderia*. Puisque le génome de celles-ci est séquencé, je me suis intéressée aux régions intergéniques conservées entre les souches PA14, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. ambifaria* et qui seraient absentes chez les souches apparentées ne codant par pour un homologue de PqsE, c'est-à-dire *P. fluorescens* et *B. mallei*.

3.3.6.2.1 Utilisation du logiciel ncDNAlign pour aligner les régions intergéniques de plusieurs génomes

De nombreux logiciels ont été mis au point pour identifier de nouveaux ARNnc. Ceux-ci ont été comparés et ont fait l'objet d'une revue qui met en emphase leurs atouts et leurs faiblesses (Kulkarni & Kulkarni, 2007). Le logiciel NcDNAlign (Rose et al., 2008) est le logiciel qui répondait le mieux aux attentes. Via ce logiciel, les régions intergéniques des souches P. aeruginosa PA14, B. ambifaria AMMD, B. thailandensis E264 et B. pseudomallei K96243 ont été alignées afin d'identifier les régions plus conservées. Ces données informatiques ont été réalisées et analysées par l'étudiant en doctorat Julien Tremblay. Aucune région spécifiquement conservée entre les différentes

souches et absentes dans les souches de *P. fluorescens* et *B. mallei* n'a été identifiée. Le meilleur alignement donne une valeur E de 10⁻³ et est présenté à la Figure 3-71. Celui-ci se situe dans une région intergénique entre les gènes PA3598 et PA3597. Il fait 149 pb. Aucun terminateur rho-indépendant typique des ARN non codants n'est présent dans cette région (Winsor *et al.*, 2005).

```
CLUSTAL 2.0.9 multiple sequence alignmentooo
1.P14_1189_1_199_+
      2.BAM_3995_1_636_+
CCGGCATTACCCTGTGCGGAAATATCG-TTTGCCGCGCGTGCTCGGGCCCCACACAATCGD
              -GACAGGCGCG-CGCTTCGGCG--CGACGCGCAGTACCCGCGCGI
 4.BTH_4386_1_480_+
 .P14_1189_1_199_+
AGGATCGGCCCGGAAAGCCGTA----GCACAACGATGGGCGCCCGAGCGTCCGCCGGTCTI
2.BAM_3995_1_636_+
3.BPM_4700_1_236_+
TACGCGCACGCGCGGATCGCCC
                     --GCGCGAGGATCGGACGGCGAGCGCCCGGCCGCACI
4.BTH_4386_1_480_+
00
1.P14_1189_1_199_
CCCGGGTGAGGGAGGCCC-CTGCGCCCGCGGGCCGGCCGGI
2.BAM_3995_1_636_+
ACAGACGAACGCGACGCGCATCGCGCCCCGCGGTTCGCCCGA0
3.BPM_4700_1_236_+
 GACGGCG-GCCGGCGCAT
                 CGCCGCGCCGCCGC-
 .BTH_4386_1_480_+
CGCGGCGGCCGCGCGCAGC-CGCGACGACGC-
CLUSTAL 2.0.9 multiple sequence alignmentoon
1.P14_1189_1_199_+
                 CGATAATTC----CGGAGTAAG--
2.BAM_3995_1_636_+
                ·GCGGAACCGC----CGCTGTCCGGCCG-I
3.BPM_4700_1_236_+
                 GGTCAATC----CGGCGAAAGCGCGAB
4.BTH_4386_1_480_+
```

Figure 3-71. Alignement par le logiciel ncDNAlign de la région intergénique la plus conservée entre les souches possédant un homologue à PqsE.

Les souches testées sont P. aeruginosa PA14, B. cepacia AMMD (B. ambifaria), B. thailandensis E264 et B. pseudomallei K96243. La valeur E est de 10⁻³ et le gap est de 0,7.

3.3.6.2.2 Utilisation du logiciel targetRNA pour identifier les ARN s'hybridant sur l'ARNm de RhIR

Parallèlement à ces travaux, j'ai également utilisé l'outil targetRNA (http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/). Ce logiciel permet d'identifier des séquences codées par des régions intergéniques qui s'hybrideraient sur un ARN messager particulier afin d'en bloquer la traduction. Cette approche est d'autant plus intéressante

que l'ARN régulateur que je cherche serait un répresseur. J'ai décidé d'analyser les séquences intergéniques capables de s'hybrider à l'ARN messager du gène *rhlR*, puisque la répression affecte non seulement la pyocyanine mais également d'autres gènes contrôlés par RhlR. Le Tableau 3-9 présente la liste des régions intergéniques qui pourraient s'hybrider sur l'ARNm de *rhlR* dans la région située entre les nucléotides -30 et +20 (région déterminée par le logiciel) de part et d'autre du codon d'initiation de la traduction.

Tableau 3-9. Liste des régions intergéniques s'hybridant avec l'ARNm de rhlR.

Rank	IG	mRNA	Score	Pvalue	IG_start	IG_stop	mRNA_start	mRNA_stop
1	rhlBrhlR	rhIR	-150	1.69422e-08	95	124	-30	-1
2	PA14_01520PA14_01540	rhIR	-77	0.0030566	110	136	-23	7
3	PA14_28760PA14_28770	rhIR	-85	0.00373955	380	413	-14	20
4	PA14_36190PA14_36200	rhIR	-79	0.00421147	239	266	-18	15
5	PA14_31770PA14_31780	rhIR	-68	0.00786277	32	71	-29	14
6	PA14_18020PA14_18040	rhIR	-81	0.00898681	41	75	-29	8

Les régions intergéniques 2 à 6 (la première est la séquence même du promoteur de *rhlR* et ne doit donc pas être prise en compte) ont été analysées afin d'identifier la présence éventuelle de terminateurs rho-indépendants, qui témoigneraient que celles-ci codent un ARN régulateur. Le site www.pseudomonas.com permet d'identifier les terminateurs rho-indépendants selon les critères publiés par Kingsford et ses collègues (Kingsford *et al.*, 2007). Les séquences intergéniques 4 et 6 possèdent respectivement un et deux terminateurs. Étant donné les scores relativement faibles obtenus et avant d'investir beaucoup de temps dans l'étude de ces régions, d'autres méthodes sont testées en espérant observer une redondance dans les résultats obtenus.

3.3.6.3 Comparaison des petits ARN présents chez PA14 et chez le mutant pqsE⁻

3.3.6.3.1 Comparaison du profil de petits ARN sur gel d'électrophorèse

Pour confronter les premiers résultats obtenus par prédiction bioinformatique, j'ai utilisé des méthodes moléculaires, toujours dans le but d'identifier un petit ARN régulateur dégradé par PqsE. Hokii et ses collègues ont mis au point une méthode de

séparation des petits ARN au moyen d'un gel d'électrophorèse à deux dimensions (2D-PAGE) (Hokii *et al.*, 2006). Celle-ci leur a permis d'identifier 12 nouveaux petits ARN non identifiés au préalable par les logiciels bioinformatiques.

3.3.6.3.1.1 Élimination des ARNm et concentration des petits ARN

J'ai utilisé la méthode par 2D-PAGE pour isoler les petits ARN présents chez le mutant pqsE et chez la souche PA14 (pDN19pqsE), qui surexprime pqsE. Les ARN ont été séparés en trois fractions, soit les ARN supérieurs à 500 nucléotides (fraction 1), de taille située entre 100 et 500 nt (fraction 2) et inférieurs à 100 nt (fraction 3). Ces fractions ont migré sur gel de polyacrylamide afin de confirmer la taille des ARN présents dans chaque fraction. La Figure 3-72A montre que la séparation a été efficace. Dans la dernière fraction, aucun ARN supérieur à 300 nucléotides n'est visible, alors que les plus petits ARN y sont présents de manière concentrée. Les fractions 2 et 3 ont été utilisées pour comparer la présence de petits ARN chez les souches pqsE et PA14 (pDN19pqsE).

Étant donné la faible séparation des différents petits ARN dans ces conditions, j'ai réalisé une seconde dimension de migration en conditions dénaturantes, tel que décrit dans l'article présentant la méthode (Hokii *et al.*, 2006). Les résultats obtenus ont été toutefois décevants. Il s'est avéré que le passage entre le gel de la première dimension et celui de la seconde dimension nuit fortement à la migration et génère une migration plus diffuse (Figure 3-72B). La seconde dimension ne sera pas utilisée pour la comparaison des échantillons.

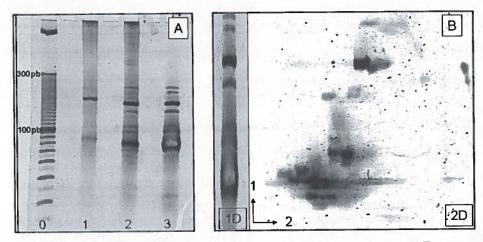


Figure 3-72. Migration sur gels de polyacrylamide des ARN du mutant pqsE. (A) Puits 0: échelle moléculaire: puits 1: ARN > 500 nt; puits 2: 500 > ARN > 100 nt; Puits 3: ARN < 100 nt. 50 µg d'ARN ont été chargés pour chaque fraction. (B) Migration sur deux dimensions de la fraction 3. (A) Première dimension en conditions natives; (B) seconde dimension en conditions dénaturantes. Les flèches et les chiffres associés indiquent le sens et la chronologie des deux migrations. 1D = profil obtenu après la première dimension; 2D = profil obtenu après les deux dimensions.

3.3.6.3.1.2 Comparaison des profils d'électrophorèse entre le mutant pqsE et PA14(pDN19pqsE)

La comparaison des petits ARN de PA14 (pDN19pqsE) et du mutant pqsE a été réalisée en triplicata à partir de l'extraction d'ARN de trois cultures bactériennes différentes pour chaque souche. Malgré une meilleure séparation des molécules, aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux souches (Figure 3-73). Cette méthode n'offre pas une résolution et une séparation suffisantes pour observer tous les petits ARN présents dans les souches.

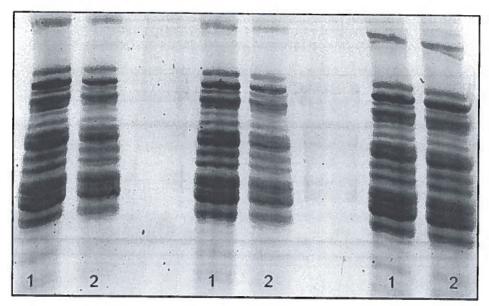


Figure 3-73. Comparaison des petits ARN de pqsE (1) et PA14 (pDN19pqsE) (2) en triplicata.

3.3.6.3.2 Application de la technique du SCOTS pour identifier les petits ARN présents uniquement chez le mutant pqsE et absents chez la souche sauvage PA14

Afin de faciliter l'identification de différences dans la présence de petits ARN en présence ou en absence de PqsE, la méthode la plus prometteuse serait l'hybridation soustractive. Celle-ci permet d'éliminer tous les ARN qu'ont en commun deux souches pour ne retenir que les ARN présents seulement dans l'une d'elles. Dans ce cas-ci, je cherche les petits ARN présents uniquement chez le mutant pqsE et absents de la souche sauvage. Le SCOTS (Selective Capture Of Transcribed Sequences) est l'une de ces méthodes d'hybridation soustractive. Une schématisation du SCOTS est présentée à la Figure 3-11 dans la section Matériel et méthodes (p199). Cette méthode possède l'avantage de travailler non pas en présence d'ARN, facilement dégradables durant les différentes étapes de l'expérimentation, mais en présence d'ADN complémentaire, beaucoup plus stable. Le SCOTS est une application servant à comparer deux conditions expérimentales et à identifier les différences d'expression génique entre celles-ci (Graham & Clark-Curtiss, 1999). Globalement, l'ADN génomique de P. aeruginosa PA14 est marqué à la biotine. Dans un premier temps, l'ADNc de PA14, obtenu à partir

de l'ARN qu'il a exprimé dans les conditions expérimentales choisies, est mélangé à l'ADN génomique pour permettre l'hybridation des ADNc sur l'ADN biotinylé. Dans un second temps, l'ADNc de pqsE, dans lequel se retrouve potentiellement l'ARN régulateur que je cherche, est ajouté à la mixture. Les ADNc du mutant pqsE qui ne sont pas exprimés dans PA14 pourront s'hybrider sur l'ADN génomique, tandis que ceux déjà exprimés dans PA14 ne pourront pas s'hybrider, leur site étant déjà occupé par l'ADNc de PA14. Enfin, toutes les séquences qui se sont hybridées avec des ADNc biotinylés sont extraites au moyen de la streptavidine. La soustraction se fait ainsi trois fois consécutivement. L'ADNc du mutant pqsE qui s'est hybridé est spécifiquement amplifié par PCR et séquencé pour en connaître l'identité.

Le SCOTS n'a jamais été utilisé pour l'identification de petits ARN. Plusieurs tests ont donc été réalisés afin de confirmer que cette méthode pourrait s'appliquer dans ce but.

3.3.6.3.2.1 Vérification de la présence des petits ARN dans l'ADN complémentaire

La première difficulté rencontrée est l'assurance de pouvoir transformer tous les petits ARN présents en ADN complémentaire. Cette transcription inverse est réalisée en présence d'amorces aléatoires. Celles-ci s'hybrident au hasard sur les ARN présents et transcrivent l'ARN en ADNc. La difficulté en présence de petits ARN est de s'assurer que malgré leur petite taille, les amorces pourront s'y hybrider et générer ainsi l'ADNc. Pour vérifier cela, j'ai suivi la présence d'un petit ARN régulateur connu de *P. aeruginosa, rsmZ*, et sa transcription inverse en ADNc en présence d'amorces aléatoires par «dot blot».

L'ADNc de PA14, obtenu dans des conditions propices à l'expression de *rsmZ*, a été fixé sur une membrane. Le produit PCR de *rsmZ* a également été fixé à la membrane pour servir de témoin. La membrane a ensuite été incubée en présence d'une sonde d'ADN marqué à la digoxygénine codant pour *rsmZ*. La Figure 3-74 montre que *rsmZ*, dont la taille est de 115 nucléotides, a été transcrit en ADNc, ce qui démontre que le SCOTS peut s'appliquer à l'étude des petits ARN.

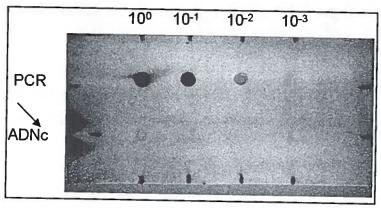


Figure 3-74. Détection de la présence du petit ARN rsmZ dans l'ADNc de PA14 par «dot blot». Le produit PCR de rsmZ et l'ADNc de PA14 ont été dilués de 1 à 1000 fois. La flèche indique la détection de rsmZ dans l'ADN complémentaire de PA14.

3.3.6.3.2.2 Purification de l'ADN complémentaire de taille inférieure à 100 nucléotides

Lors de la transcription inverse, des amorces aléatoires sont utilisées. Celles-ci doivent être impérativement enlevées pour la suite du protocole, puisque d'autres amplifications au moyen d'autres amorces seront effectuées par la suite. Comment s'assurer d'éliminer toutes les amorces aléatoires sans perdre les petits ADNc de 70-100 nucléotides qui sont à l'étude ? Plusieurs protocoles ont été testés. La purification par extraction sur gel a d'abord été choisie, puisque c'est la méthode la plus fiable pour récupérer les ADNc seulement et éliminer les amorces. Toutefois, la trop grande quantité de gel à dissoudre a fait obstacle à la purification. De l'agarase (New Englands Biolabs, M0392S) a été ajoutée selon les instructions du fournisseur pour faciliter la dissolution du gel mais n'a donné qu'une très faible récupération des ADNc. Le kit Qiaex II (Qiagen), spécialisé pour récupérer des fragments aussi petits que 40 nucléotides, a été utilisé également mais de fortes pertes ont également eu lieu lors de l'extraction sur gel. Ce kit permet également de purifier un produit directement sans passage préalable sur gel, mais n'est pas recommandé pour éliminer les amorces PCR. Cette solution a été tentée mais devait être validée afin de confirmer l'élimination de toutes les amorces présentes dans le produit. Après purification avec le kit Qiaex II sans passage sur gel, aucune amplification n'a eu lieu par PCR en absence d'ajout d'amorces, et ce à toutes les températures d'hybridation testées. Par contre, un ajout d'amorces amplifiant l'ADNc de pqsE a généré une amplification avec une température d'hybridation située entre 57 et 64°C. Ces

résultats confirment que le kit QiaexII peut être utilisé pour éliminer les amorces dans l'application de la méthode SCOTS pour l'étude des petits ARN.

3.3.6.3.2.3 Analyse des résultats obtenus par SCOTS : identification des petits ARN présents uniquement en absence de PqsE

3.3.6.3.2.3.1 Identification des séquences intergéniques obtenues par SCOTS

J'ai mis au point la totalité du protocole SCOTS, j'ai préparé les échantillons d'acides nucléiques nécessaires pour toute la méthode et ai réalisé les trois premières rondes d'hybridation visant à enrichir l'ADNc des souches PA14 et pqsE. Les trois rondes de soustraction ont ensuite été effectuées par le Dr. Martin Lamarche, post-doctorant dans le laboratoire du Dr. Déziel, qui reprend la suite du projet. La compilation des séquences obtenues a été traitée par bioinformatique par l'étudiant au doctorat Julien Tremblay. Exactement 383 fragments d'ADNc résultant de l'enrichissement ont été clonés et séquencés. Parmi eux, 272 sont codés sur 144 ORF différentes exclusivement. Il est notable que 97 séquences chevauchent un cadre de lecture et une région intergénique, et que 13 sont codées exclusivement sur 8 régions intergéniques différentes. Ces gènes et régions intergéniques sont listés à l'Appendice G.

Les séquences codées exclusivement ou principalement par un cadre de lecture ouvert, et débordant sur une région intergénique, représentent probablement l'ARN messager comprenant la région codante et la séquence promotrice qui la régule. Ces séquences sont donc moins intéressantes pour ce projet. Les séquences codées exclusivement ou presque dans des régions intergéniques sont présentées à la Figure 3-75. Pour débuter l'étude de ces régions intergéniques, les travaux se concentreront sur les séquences codées exclusivement sur des régions non codantes.

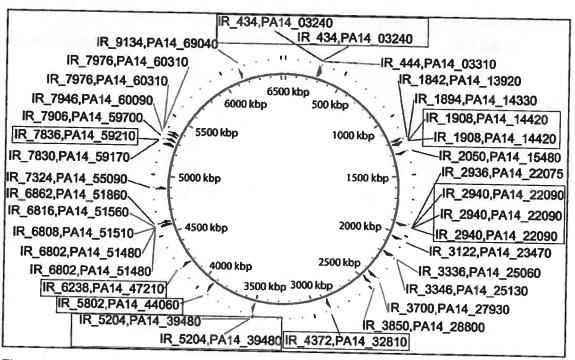


Figure 3-75. Localisation des séquences codées majoritairement ou exclusivement dans des régions intergéniques sur le génome de PA14 (figure réalisée par Julien Tremblay).
Les 13 séquences situées exclusivement sur des régions intergéniques sont encadrées.

3.3.6.3.2.3.2 Présence des régions intergéniques identifiées sur la biopuce Affymétrix

Dans le transcriptome du mutant *pqsE*, deux régions intergéniques (ig_6125795_6125079 et ig_727608_721556) montrent une expression supérieure à celle de la souche sauvage PA14. La première séquence se situe entre les gènes PA5440 et PA5441 (il faut souligner que la biopuce Affymétrix utilise comme sondes les séquences génétiques non pas de PA14 mais bien de PAO1). Néanmoins, la région orthologue chez PA14 montre que cette séquence d'ADN code en réalité un gène (PA14_71830), absent chez PAO1, selon les annotations disponibles sur le site www.pseudomonas.com (Figure 3-76). Quant à la seconde séquence, elle code de l'ARN ribosomal. Ces deux régions ne correspondant donc pas à des régions intergéniques susceptibles de coder un ARNnc chez PA14, elles n'ont donc pas été davantage étudiées.

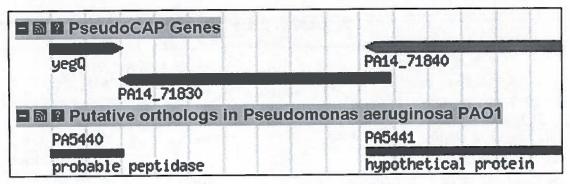


Figure 3-76. Comparaison de la région intergénique ig_6125795_6125079 chez PAO1 et de sa région orthologue chez PA14 (www.pseudomonas.com).

Si PqsE agit sur un petit ARN en le dégradant, pourquoi n'a-t-il pas été identifié lors de cette étude transcriptomique ? Les régions identifiées par le SCOTS sont-elles présentes sur les biopuces Affymétrix utilisées pour l'étude du transcriptome des souches de *P. aeruginosa* ? Afin de le vérifier, j'ai identifié les gènes avoisinant ces régions intergéniques dans PA14 et j'ai analysé la présence d'orthologues à ceux-ci dans PA01. Le Tableau 3-10 montre que 4 (IR_2940, IR_4372, IR_5802, IR_7836) des 8 régions identifiées par le SCOTS ne sont pas présentes sur la biopuce. Sur les 4 régions présentes sur celle-ci, une seule (IR_6238) se situe dans une région conservée entre PA14 et PA01. Les trois autres montrent des divergences entre les deux souches au niveau des gènes avoisinant la région intergénique, ce qui suggère que celles-ci puissent être différentes de celles dans PA14. Ainsi, 7 des 8 régions intergéniques identifiées par le SCOTS ne peuvent pas être détectées par la biopuce Affymétrix.

Tableau 3-10. Analyse des régions intergéniques identifiées par le SCOTS et recherche de région orthologue chez la souche PAO1.

BLAST de la	RI de PA14	es PA14 sur le génome Genes PAO1 Riprésente sur la puce	RI dans PAO1 de PAO1 ⁽³⁾	4795253-479-48173 P.A.38735 at	4294606-4297249 (94.9%) PA3836 in 4294604 4297249 at			1	4_03240 et DA 14 01340 cathalama & DA 0243	297561-299522 (98,76%) PA0264 is 297561 299081 at		/ PA2462 //	4_39480 et 2116667.2116771 PA1934 et PA14 39500 autholomie 3 DA1028	2116266-2117029 (92,57%) 1935 ig 2116265 2117030 at	1720743-172036 PA1581 et	1720396-1720743	1428079-1427454 PA1317 et	1427454-1428079	- 59210 et	
		Genes PA14	avoisinants RI dans	PA14_14420 et		PA14_22090 et	22100		PA14_03240 et	-	PA14_32810 et	32820	PA14_39480 et		PA14_44060 et		PA14_47210 et		PA14_59210 et	59220
	Al	RI entière dans Gènes PA14	PA14		2 1229643 1231206 14430		3 19241331926577 22100			2 288973291567		28654912868299 32820		2 331 <i>524</i> 7.3516129 39500		3922766.3923113 44070		4206554, 4207179 47230		5274637_5275323 59220
	Redondance	dans le	SCOTS		,7		(2)			2				2						
		Nom de la	RI		IR 1908		IR 2940			IR 434		IR 4372		IR 5204		IR 5802		IR 6238		IR_7836

(1) Les sequences presentes sur la biopuce Affymetrix de PAO1 sont disponibles sur internet (http://www affymetrix.com/browse/products.jsp?product1d=131484&navMode=34000&navAction=jump&ald=productsNav#1_3).
(2) La recherche de régions orthologues se base sur l'identification des gènes de la souche PAO1 orthologues aux gènes de part et d'autre de la région intergénique étudiée, en utilisant les outils disponibles sur www.pseudomonas.com.
(3) La méthode de recherche de régions orthologues a été confirmée en réalisant un BLAST de la région intergénique entière de PA14 sur le génome de PAO1.

301

Pour le moment, la caractérisation des 8 régions intergéniques identifiées par le SCOTS est en cours. Ces régions vont être délétées chez le mutant *pqsE*. Si l'une d'entre elles code le répresseur recherché, le mutant obtenu devrait produire de la pyocyanine.

3.4 Discussion et perspectives

La protéine PqsE est une protéine essentielle pour la pleine expression de la virulence et de nombreux gènes dépendants du QS chez *P. aeruginosa*. Son étude est indispensable pour comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans ce système de communication intercellulaire. En effet, si celui-ci est inhibé au moyen de certains composés, il pourrait être une cible très intéressante dans l'élaboration de traitements antibactériens contre *P. aeruginosa*.

Le gène pqsE a été rapporté pour la première fois en 2002, lors d'une mutagenèse ciblant des mutants déficients dans la production de pyocyanine, un facteur de virulence contrôlé par le QS chez P. aeruginosa (Gallagher et al., 2002). Depuis près de huit ans, de nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur l'étude du rôle de PqsE. Les premières publications ayant comme sujet principal cette protéine et sa fonction n'ont commencé à paraître que ces deux dernières années, et à ce jour sa fonction n'a toujours pas été élucidée (Farrow et al., 2008; Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010; Yu et al., 2009).

Au cours de ma thèse de doctorat, j'ai exploré de très nombreuses avenues dans la recherche de la fonction de PqsE. Les principales avancées dans ce domaine sont discutées dans cette section. Celle-ci est divisée en sous-sections reprenant chacune des caractéristiques étudiées de PqsE. Par la suite, les différentes caractéristiques seront remises en contexte pour présenter les hypothèses les plus probables sur la fonction de PqsE.

3.4.1 PqsE est une métallo- β-lactamase unique

3.4.1.1 PqsE appartient à la grande famille des métallo-hydrolases mais ne clive pas de noyau β -lactame

L'étude de la structure primaire de PqsE a permis d'identifier certains domaines fonctionnels tels que le COG0491 et le pfam00753. La superfamille des hydrolases dépendantes du zinc ou MBL pour Metallo-β-lactamases et possédant le domaine COG0491 regroupe 16 sous-familles aux fonctions biologiques très différentes les unes des autres (Bebrone, 2007; Daiyasu *et al.*, 2001), ce qui ne permet pas de déterminer une fonction pour PqsE basée sur son homologie avec ce domaine conservé. Quant au domaine pfam00753, il appartient à l'une de ces 16 sous-familles, celle des métallo-β-lactamases de classe B (groupe 1), impliquée dans l'hydrolyse des noyaux β-lactames et constituée de 3 sous-groupes, les B1, B2 et B3 (Garau *et al.*, 2005). Les sous-groupes B1 et B3 regroupent des métallo-β-lactamases à large spectre, tandis que le sous-groupe B2 possède un spectre plus étroit (Boschi *et al.*, 2000). Toutefois, les tests réalisés à la section 3.3.1.3 p207 montrent que PqsE n'est pas impliqué dans la résistance aux β-lactames. PqsE ne fait donc vraisemblablement pas partie de ce groupe.

3.4.1.2 PqsE n'appartient à aucune sous-famille existante de métallohydrolases

Au sein des 15 autres groupes de la superfamille des métallo- β -lactamases se retrouvent des enzymes possédant un profil de lactamase mais agissant sur des substrats autres que les β -lactames (Daiyasu *et al.*, 2001). Cinq domaines conservés caractérisent cette superfamille et tous ses membres ont également une structure secondaire $\alpha\beta\beta\alpha$.

Le motif 2 est le plus caractéristique et possède la région HxHxDH très conservée parmi toutes les familles des hydrolases dépendantes du zinc. Cette région participe à la fixation du métal sur la protéine. Sur les cinq motifs caractéristiques des hydrolases, les motifs 2, 3, 4 et 5 sont présents dans la séquence de PqsE, ce qui indique qu'elle pourrait effectivement faire partie de l'une des sous-familles d'hydrolases dépendantes du zinc.

3.4.1.2.1 Caractéristiques communes avec les hydrolases métabolisant l'ARN

Selon les résultats obtenus avec le logiciel BLOCKS (voir section 3.3.1.6 p210), les homologies de séquence les plus fortes avec la séquence de PqsE se font avec un domaine IPR011108 présent sur les hydrolases impliquées dans le métabolisme de l'ARN. Ces hydrolases sont principalement impliquées dans le clivage et la polyadénylation des ARN (groupe 6) chez les eucaryotes et chez les archéobactéries (Daiyasu *et al.*, 2001). Toutefois, le logiciel BLOCKS n'a détecté qu'un seul des trois motifs conservés du domaine IPR011108 dans PqsE. PqsE ne possède pas non plus les domaines pfam07521 et β-CASP, présents sur toutes les enzymes possédant le domaine IPR011108 (http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR011108#PUB00014290).

3.4.1.2.2 Caractéristiques communes avec les hydrolases se liant au fer

L'an dernier, un groupe de chercheurs a publié la structure cristalline de PqsE (Yu et al., 2009). Ceux-ci ont divulgué des renseignements intéressants sur cette enzyme. Elle possède bien la structure αββα typique des métallo-β-lactamases, mais possède deux hélices alpha supplémentaires dans sa région C-terminale, ce qui limite l'accès à son site catalytique. Par contre, la disposition de ce dernier en deux tunnels opposés suggère que le substrat de PqsE puisse être une molécule de forme allongée. Les atomes métalliques observés au niveau des sites de liaison de PqsE montrent qu'elle se lie au fer et non pas au zinc. Les hydrolases connues pour lier le fer appartiennent au groupe des glyoxalases de type II (groupe 2), des flavoprotéines de type A dont la rubrédoxine:oxygène oxydoréductase (groupe 3) (Gomes et al., 2002), des arylsulfatases (groupe 4), des protéines de liaison à la choline (groupe 9) (Bebrone, 2007) et des monoxygénases (groupe 11) (Daiyasu et al., 2001). Puisque PqsE lie le fer, elle pourrait donc appartenir à l'un de ces sous-groupes.

Lors d'une étude répertoriant des glyoxalases putatives dans de nombreux génomes procaryotes et eucaryotes, PqsE a été sélectionnée comme candidate et a été alignée avec les autres glyoxalases de type II putatives (Ridderstrom & Mannervik, 1997). J'ai donc testé l'activité glyoxalase de PqsE et démontré que cette protéine n'intervenait pas dans le métabolisme du glyoxal (section 3.3.1.4 p209).

Puisque les arylsulfatases sont également connues pour lier le fer, et que le logiciel de prédiction de structure protéique ROBETTA associe la structure prédite de PqsE à celle de l'arylsulfatase SdsA1, son activité sulfatase a été testée (section 3.3.1.5 p209). Les résultats obtenus n'ont pas permis d'appuyer l'hypothèse de l'appartenance de PqsE à ce sous-groupe d'hydrolases.

La plus grande difficulté réside dans le fait que PqsE ne partage toutes ses caractéristiques avec aucune des 16 sous-familles d'hydrolases. De plus, aucune hydrolase n'est connue pour affecter des centaines de gènes chez une bactérie, ce qui rend PqsE unique. Un récapitulatif des différentes sous-familles et des caractéristiques qu'elles partagent ou non avec PqsE est présenté dans le Tableau 3-11.

Tableau 3-11. Liste des sous-groupes appartenant à la superfamille des métallo-β-lactamases (Bebrone, 2007; Daiyasu *et al.*, 2001) et leurs caractéristiques connues semblables ou différentes de

Po	sE.	
. u		

PqsE.			
Numéro du	Activité enzymatique	Caractéristiques	Caractéristiques
groupe		communes avec PqsE	absentes de PqsE
1	métallo-β-lactamases de classe B	Environ 250-300 acides	activité antibiotique, pas
		aminés	de liaison au fer
2	Glyoxalases de type II	Liaison au fer, environ	Détoxification du
		250 acides aminés	glyoxal
3	Flavoprotéines	Liaison au fer	Domaine flavodoxine
4	Arylsulfatases	300 acides aminés, lient	Activité arylsulfatase
	Ť	le fer	
5	Cyclases		
6	Facteurs de clivage et de	La plus forte homologie	Environ 500-600 acides
	polyadénylation	de séquence	aminés; motif de liaison
			à l'ARN; chez les
	:		eucaryotes et les
			archaebactéries
7	Réparation de l'ADN		Eucaryotes et
'	Reparation de l'iller		archaebactéries,
			domaine beta-CASP,
			pas de motif 5
8	Clivage de l'ADN pour		Région de liaison à la
0	transformation naturelle		membrane, pas de motif
	l ansioi mation naturene		3
9	Protéines de liaison à la choline	Lient le fer	Domaine de liaison à la
	1 totemes de naison a la chomie		choline
10	Utilisation du phosphonate		0.00.00
10	(PhnP)		1
11	CMP-N-acetylneuraminate	Lient le fer	Chez les eucaryotes
11	monoxygénases	Lient ie iei	Chez les cueuryetes
12	Résistance antibiotique		Résistance antibiotique
13	Alkyl sulfatases		10000tarioe aminorotique
14			700 acides aminés, deux
14	1 3		régions associées aux
1	(insecticide)		métallo-hydrolases
1.6	TT-1-1		metano-nyurotases
15	Hydrolases de méthylparathion		
	(insecticide)		
16	Phosphodiestérases	l	1

3,4.2 PqsE affecte de nombreux facteurs contrôlés par le quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Outre le fait que PqsE possède tous les domaines enzymatiques pour être une métallo-hydrolase, on sait également qu'il agit sur un très grand nombre de gènes contrôlés par le QS (Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010). La caractérisation approfondie du mutant pqsE a été réalisée afin d'identifier clairement les facteurs dépendants de PqsE.

3.4.2.1 Caractéristiques du mutant pqsE selon les conditions expérimentales

Le mutant pqsE a entre autres été soumis à près de 20 000 conditions expérimentales différentes par Phenotype Microarrays. Cette étude a indiqué que le mutant pqsE résiste davantage à l'acide 5-fluoro-orotique, bien que je ne sois pas parvenue à répéter ces résultats au laboratoire. Il est toutefois très intéressant de mentionner que le 5-fluoro-uracile réprime la formation de biofilms, abolit l'expression de gènes contrôlés par le QS et diminue la virulence de P. aeruginosa (Ueda et al., 2009). Inversement, l'ajout d'uracile dans un mutant pyrF (déficient dans la synthèse d'uracile) produisant peu de pyocyanine, de rhamnolipides et de PQS a permis de restaurer la production de ces trois composés. Cette équipe de chercheurs a également démontré que la régulation par l'uracile se faisait via l'UMP (uridine mono-phosphate) et la voie de production des pyrimidines pour la synthèse de l'ARN. Il serait donc judicieux d'analyser l'impact réel du 5-FOA et de l'uracile sur la souche sauvage et sur le mutant pqsE afin de déterminer si PqsE pourrait intervenir dans la voie de synthèse des pyrimidines.

Les Phenotype Microarrays ont montré que le mutant pqsE est plus sensible que la souche sauvage à la présence de la putrescine et du 2,2-dipyridyl. Le 2,2-dipyridyl est un agent chélateur. PqsE affecte l'expression de plusieurs gènes liés à l'acquisition du fer, mais certains sont activés tandis que d'autres sont réprimés (Hazan et al., 2010). Le lien entre le fer et PqsE est donc complexe et n'a pas encore été étudié de manière approfondie. Quant à la putrescine, elle appartient à la famille des polyamines, qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la modulation des fonctions de l'ADN et de l'ARN en se fixant sur les acides nucléiques (Morgan et al., 1987), et la protection contre les dommages oxydatifs (Jung & Kim, 2003). Les polyamines peuvent également affecter la production de biofilms chez Vibrio cholerae (Karatan et al., 2005). Les polyamines bloquent également les porines de la membrane cellulaire, ce qui peut protéger la bactérie contre l'acide, mais qui affecte la croissance à pH élevé (Yohannes et al., 2005). Puisque PqsE a une croissance plus affectée que celle de la souche sauvage en présence de putrescine à pH élevé, cela signifie qu'il est davantage sensible au stress des polyamines. Ces informations n'ont pas encore été investiguées dans le cadre de l'étude sur PqsE mais pourront faire l'objet d'une recherche plus poussée dans le futur.

Durant les tous derniers mois de ma thèse de doctorat, deux études transcriptomiques sur le mutant pasE ont été publiées (Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010). Comme collaboratrice du Dr. Ronen Hazan et contributrice à la publication dont il est premier auteur, j'ai eu accès aux premiers résultats transcriptomiques obtenus. De nombreuses expériences ont visé à confirmer l'effet de PqsE sur plusieurs gènes présents dans ces données. Ainsi, j'ai confirmé que PqsE régule les gènes hcnABC de production de cyanure d'hydrogène, les gènes rhlAB de production de rhamnolipides, les gènes pqsABCDE de production de HAQ, les gènes mexGHI-opmD codant pour une pompe à efflux contrôlée par le QS, les gènes phzA1-G1 et phzA2-G2 de biosynthèse de phénazines (les gènes phzA1-G1 et mexGHI-opmD avaient également été confirmés au moyen de rapporteurs transcriptionnels précédemment (Déziel et al., 2005)). J'ai également démontré que certains de ceux-ci, tels que les gènes mexGHI-opmD, étaient affectés indirectement à cause de l'effet de PqsE sur la pyocyanine et sur le stress oxydatif qu'elle génère (Dietrich et al., 2006), alors que d'autres tels que rhlAB et hcnABC étaient affectés indépendamment de la présence ou non de stress oxydatif. Dans le but de trouver le point commun le plus antérieur possible entre tous les gènes affectés dans un mutant pqsE, il s'est avéré que tous ont un lien avec le QS. C'est donc cette avenue qui a été explorée le plus exhaustivement par la suite.

3.4.3 Recherche du substrat de PqsE

Pour concilier les deux affirmations selon lesquelles PqsE serait une hydrolase et qu'elle influence l'expression de nombreux gènes, il faut supposer que PqsE agisse sur un facteur de régulation, car une hydrolase n'a pas la capacité d'activer elle-même la transcription de tant de gènes.

Il est peu probable que ce facteur soit une protéine, car aucune protéine intracellulaire n'a été clairement identifiée comme cible directe de PqsE lors de l'analyse des gels protéiques bidimensionnels (voir section 3.3.2.3.1 p224). Toutefois, seules les protéines intracellulaires du mutant pqsE ont été étudiées, ce qui ne représente qu'une partie de son protéome complet. Néanmoins, puisque PqsE semble avoir une fonction intracellulaire et qu'un surnageant de la souche sauvage ne peut complémenter un mutant pqsE, sa cible directe doit se trouver dans la fraction intracellulaire.

Deux difficultés viennent affaiblir l'étude protéomique de pqsE par gel bidimensionnel. D'une part, au vu des très nombreux gènes dont la transcription est affectée par une mutation de pqsE (Hazan et al., 2010), il est probable que la plupart, sinon toutes les protéines différentiellement exprimées chez ce mutant ne sont que l'effet indirect de PqsE (via son effet sur la transcription des gènes qui les codent) et non des cibles ou des substrats directs. Au vu des résultats obtenus, la méthode ne fournit pas d'informations supplémentaires à celles déjà connues dans les données transcriptomiques. D'autre part, les gels bidimensionnels ne permettent pas d'identifier une modification subtile d'une protéine. Il ne faut donc pas exclure la possibilité que la cible directe de PqsE puisse être une protéine, qui serait légèrement modifiée par PqsE. Pour ces deux raisons, l'étude protéomique par gels bidimensionnels du mutant pqsE n'a pas été davantage approfondie.

L'hypothèse la plus plausible reste que le substrat direct de PqsE est une petite molécule hydrolysable jouant un rôle dans la régulation de nombreux gènes, dont la plupart sont contrôlés par le QS.

3.4.3.1 PqsE n'agit pas sur les molécules-signal les plus communes du quorum sensing

Un grand volet de l'étude de PqsE a été de vérifier si elle peut hydrolyser les molécules-signal des différents systèmes de QS chez *P. aeruginosa*, soit les AHL et les HAQ. J'ai clairement démontré que PqsE n'agit pas sur le métabolisme des AHL et des HAQ, ce qui a fait l'objet d'un article publié cette année en collaboration avec le laboratoire de la Dre Laurence Rahme (Hazan *et al.*, 2010), et qui a été également observé dans d'autres laboratoires (Farrow *et al.*, 2008). Ceci avait déjà été suggéré auparavant (Déziel *et al.*, 2005; Gallagher *et al.*, 2002). Néanmoins, plusieurs observations méritent d'être discutées relativement à cette étude.

3.4.3.1.1 Résumé des molécules différemment produites entre pqsE et la souche sauvage

Lors de la comparaison des molécules dérivées de l'acide anthranilique entre les souches pqsE et PA14, cinq nouvelles molécules ont été observées. Les molécules V et E, isolées par chromatographie en couche mince, n'ont pas été identifiées, par manque de

matériel et de reproductibilité ou par manque de méthode adéquate de détection, respectivement. Les molécules de m/z+1 = 279 et 295 au LC-MS, appelées VD279 et VD295, sont deux nouvelles molécules présentes uniquement lorsque PqsE est absent. Quant à la molécule VD323, celle-ci est un artéfact créé lors du passage de l'échantillon dans le LC-MS, et équivaut à deux molécules de DHQ associées. La présence de cet artefact uniquement chez le mutant pqsE est due au fait que celui-ci produit une quantité plus importante de DHQ par rapport à la souche sauvage (voir Figure 3-30, p. 238). Cette observation permet également de proposer une hypothèse pour la molécule E, trouvée uniquement chez le mutant pqsE par TLC, dérivée de l'acide anthranilique mais non identifiable tant en mode positif qu'en mode négatif par LC-MS (voir section 3.3.3.1.1.2, p. 233). Celle-ci pourrait en effet être le précurseur polaire des HAQ, que j'ai tenté d'identifier au chapitre 2. Puisqu'il semblerait que le mutant pqsE accumule les produits de PqsA et PqsD tels que le DHQ, il se pourrait qu'il accumule également ce précurseur. Cette hypothèse pourra être vérifiée lorsque l'identité du précurseur et sa méthode de détection seront connues.

Hormis ces cinq molécules, aucune autre n'a été identifiée. Une attention toute particulière a été portée sur la production des HAQ, mais les résultats ont très clairement démontré que PqsE ne nécessite aucune d'entre elles pour être fonctionnel. Quant aux AHL, également étudiées en profondeur, elles ne sont de toute évidence pas modifiées ou dégradées par cette enzyme, du moins au niveau extracellulaire.

3.4.3.1.2 Caractérisation du VD279

La molécule VD295 est une molécule apparentée au VD279 mais possédant un groupement hydroxyle supplémentaire. Pour plus de facilité et parce qu'elle se concentre et se purifie plus facilement, seule VD279 a été étudié en profondeur. Celle-ci nécessite la présence des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD pour être synthétisée. Elle ne provient ni du DHQ, ni du HHQ ni du PQS, et aucune de ces molécules ne dérive du VD279. Elle s'accumule dans le temps et sa production est augmentée lors de la surexpression des enzymes PqsABCD en présence d'acide anthranilique. VD279 possède deux noyaux provenant de l'acide anthranilique, comme l'ont montré les expériences de marquage. Ceci permet de proposer une voie de biosynthèse pour cette molécule,

présentée à la Figure 3-77. Elle résulterait de la condensation de deux molécules d'acide anthranilique accompagnée d'une cyclisation intramoléculaire spontanée.

Figure 3-77. Schéma hypothétique de biosynthèse du VD279.

Malgré de nombreux essais, je n'ai pu observer aucune activité biologique de la molécule VD279. Elle n'affecte ni la croissance, ni la production de pyocyanine, ni ne possède d'activité antimicrobienne. Une légère augmentation de la transcription de l'opéron pqsABCDE a été observée, mais celle-ci est négligeable par rapport à celle observée en présence de HHQ et surtout de PQS. Des tests visant à vérifier si PqsE dégradait cette molécule ont montré que ce n'était pas le cas. VD279 est donc probablement une conséquence indirecte de l'absence de PqsE et non le substrat de cette protéine. Par ailleurs, l'expression de tout l'opéron pqsABCDE est augmentée chez le mutant pqsE, ce qui mène par exemple à une surproduction de DHQ. L'augmentation de l'expression de l'opéron peut également aboutir à l'accumulation de certains intermédiaires ou autres produits secondaires, généralement non visibles ou non produits en conditions normales. Finalement, le manque de fonction biologique attribuable à la molécule VD279 a confirmé que celle-ci n'est pas impliquée dans le rôle de PqsE et a donc été écartée du projet.

3.4.3.1.3 PqsE n'intervient pas dans la production des HAQ mais affecte la production d'acide anthranilique

La Figure 3-47 (p. 258) montre qu'un mutant pqsE produit nettement moins d'acide anthranilique que la souche sauvage. Les résultats sont en accord avec ceux publiés récemment, montrant une accumulation d'acide anthranilique lorsque PqsE est surexprimé dans la souche sauvage (Hazan et al., 2010). Sa diminution dans le mutant

pqsE n'affecte toutefois pas la production de ses dérivés. Il est même surprenant d'observer une augmentation de la production de DHQ dans ce mutant.

La diminution observée est-elle due à une diminution de la production d'acide anthranilique, ou à une augmentation de l'expression des enzymes qui le dégradent? Les tests réalisés avec le rapporteur transcriptionnel *phnAB-lacZ* ne montrent pas de différence de transcription entre la souche sauvage et le mutant *pqsE*. La diminution de l'expression des gènes *antABC* ne se retrouve pas dans le transcriptome du mutant *pqsE* (Hazan *et al.*, 2010). Il serait intéressant de confirmer ce résultat par qRT-PCR et de suivre également les gènes de dégradation de l'acide anthranilique, soit les gènes *antABC*. Il se peut également que la diminution d'acide anthranilique observée soit due à la forte production de DHQ.

3.4.3.1.4 Comment peut-on affecter la transcription de l'opéron pqsABCDE sans altérer la production de HAQ?

J'ai présenté des résultats selon lesquels PqsE affecte négativement la transcription de l'opéron pqsABCDE. En effet, la transcription de l'opéron est augmentée en son absence (Figure 3-46, p. 257) et diminuée si on le surexprime (Figure 3-50, p. 262). Ces données semblent en contradiction avec l'observation selon laquelle une mutation dans pqsE n'affecte pas la production des HAQ. En réalité l'effet de PqsE sur la transcription de l'opéron se reflète sur la production de DHQ (Figure 3-30, p. 238), puisque chez la souche sauvage, ces deux paramètres sont diminués une fois que la protéine PqsE est exprimée, c'est-à-dire vers une $DO_{600} = 4$, et que cette diminution ne s'observe pas chez le mutant pqsE. La question est donc de comprendre pourquoi le DHQ, tout comme le VD279, sont surproduits dans un mutant pqsE, en accord avec l'expression de pqsABCDE, mais pas les HAQ?

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Il est possible qu'en absence de PqsE, une molécule inhibitrice vienne bloquer les enzymes PqsB ou PqsC, ou qu'un facteur de régulation positive soit manquant. Ce facteur pourrait agir de manière transcriptionnelle. En effet, aucune étude n'a été réalisée pour confirmer les prédictions informatiques selon lesquelles les gènes *pqsABCDE* étaient bien codés sur un même ARN messager. Ceci pourrait se faire par RT-PCR, en suivant la présence des régions situées entre chacun des

cinq gènes, chez la souche sauvage PA14 et chez le mutant pqsE. On pourrait ainsi vérifier si dans un mutant pqsE la transcription des gènes pqsB et pqsC ressemble ou non à celle de pqsA et pqsD. Pour vérifier si la régulation est davantage post-transcriptionnelle, il serait intéressant de quantifier la production des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD chez le mutant pqsE. Toutefois, bien que cette hypothèse puisse expliquer l'augmentation de DHQ et l'absence d'effet sur les HAQ dans le mutant pqsE, elle n'explique pas la présence de VD279 ou VD295, qui requièrent PqsB et PqsC.

Il est également possible que le HHQ, le PQS et le HQNO nécessitent la présence de gènes inconnus affectés positivement par PqsE. Le chapitre précédent suggère très fortement qu'aucune autre enzyme en dehors de celles de l'opéron pqsABCDE n'est impliquée dans la transformation d'acide anthranilique en HAQ. Néanmoins, la formation du HHQ, du HQNO et du PQS nécessite un précurseur de leur chaîne acyle, précurseur n'affectant aucunement le DHQ, VD279 ou VD295, tous dépourvus de cette chaîne. Ce précurseur pourrait donc être affecté dans un mutant pqsE. L'hypothèse la plus probable est donc qu'une mutation dans le gène pqsE affecte les produits de l'opéron pqsABCDE de deux façons opposées. La première est une action positive qui induit une augmentation de la transcription de pqsA au moins, ce qui génère une augmentation de production du DHQ et de VD279 et VD295. La seconde est une action négative sur la production d'un éventuel précurseur de la chaîne acyle, ce qui contrebalancerait l'effet positif énoncé, dans le cas de la production des HAQ. Cette hypothèse est en accord avec toutes les expériences réalisées pour le DHQ, le VD279 et les HAQ. Elle explique pourquoi un ajout d'acide anthranilique dans le mutant pqsE augmente la production de DHQ et de VD279 seulement, sans affecter la production des HAQ, puisque le précurseur acyle serait toujours limitant pour ces derniers en absence de pqsE. Elle explique également la plus faible quantité d'acide anthranilique trouvée dans un mutant pqsE, puisque ce dernier produit autant de HHQ, HQNO et PQS mais cinq fois plus de DHQ que la souche sauvage. L'acide anthranilique est donc davantage utilisé dans cette souche. Il s'avère également qu'un ajout d'acide anthranilique dans la souche sauvage ne permet pas d'augmenter la production des HAQ (voir Figure 3-47, p. 258), tandis que celle du DHQ l'est, ce qui confirme une fois de plus l'hypothèse de l'effet de PqsE sur la synthèse du précurseur acyle des HAQ.

Il reste néanmoins à comprendre pourquoi la surexpression de *pqsE* induit un effet négatif important sur la production des HAQ, qui n'est cette fois pas suffisamment contrebalancé par l'effet positif hypothétique sur le précurseur de la chaîne acyle. Il se pourrait par exemple que ce précurseur soit déjà exprimé de manière maximale en présence d'une copie, et qu'une surexpression de pqsE ne permette pas d'en augmenter encore l'expression.

3.4.3.2 PqsE agit sur un facteur intracellulaire

Il s'est avéré que le surnageant de la souche sauvage ne contient pas de produit généré par PqsE permettant de complémenter un mutant pqsE (voir section 3.3.1.7, p. 211). La cible de PqsE aurait donc la caractéristique d'être intracellulaire. L'étude de l'effet de PqsE sur les HAQ, sur les AHL et sur les autres molécules extracellulaires produites par *P. aeruginosa* a donc été mise de côté après cette constatation.

3.4.3.2.1 Un substrat protéique pour PqsE?

Les facteurs de régulation du QS intracellulaire sont en général des protéines. Que la cible de PqsE soit une protéine est une hypothèse qui se concilie moins bien avec les propriétés d'hydrolase de cette enzyme. Néanmoins, il existe certaines hydrolases connues pour cliver des régulateurs. Chez *B. subtilis*, le régulateur RsbP impliqué dans la réponse au stress nécessite la réaction catalytique d'une α-β hydrolase, RsbQ, pour être fonctionnelle (Kaneko *et al.*, 2005). L'hypothèse proposée est que RsbQ fournisse un cofacteur à RsbP. Par contre, PqsE possède très peu d'homologies avec RsbQ. Cette dernière ne possède pas le motif HxHxDH caractéristique des métallo-hydrolases. Elle ne possède pas non plus les mêmes domaines fonctionnels que PqsE. Toutefois, le caractère unique de PqsE oblige à envisager qu'elle puisse agir sur ce type de substrat.

Un autre indice portant à s'intéresser aux protéines comme substrat de PqsE est le fait que PqsE réprime la transcription de l'opéron pqsABCDE via une région portant une séquence lux. Il faudra donc investiguer davantage les différents régulateurs de type LuxR présents chez P. aeruginosa. Outre RhlR, LasR et QscR, trois autres protéines appartiendraient à cette famille de régulateurs. Les produits des gènes PA14_49700

(PA1136), PA14_63520 (PA4806) et PA14_17720 (PA3599) possèdent tous une signature de type LuxR (www.pseudomonas.com). Ceux-ci pourraient faire l'objet d'une étude approfondie afin d'analyser leur lien éventuel avec PqsE. Une première étape sera de vérifier si l'un de ces régulateurs affecte la transcription ou l'activité de l'opéron pqsABCDE via la séquence lux identifiée sur la région promotrice (Xiao et al., 2006b). Il est également possible de déceler un clivage ou une modification de l'un de ces régulateurs en présence ou en absence de PqsE par protéomique et par spectrométrie de masse. Le gène codant pour le régulateur potentiel est fusionné avec une étiquette, exprimé chez les souches PA14 et pqsE, et l'extrait protéique de ces deux souches migre sur un gel SDS-PAGE. La présence de la protéine d'intérêt est révélée au moyen d'anticorps ciblant son étiquette. Dans le cas d'une modification ou d'un clivage de la protéine, la migration de celle-ci sera différente entre les deux souches. La modification peut ensuite être caractérisée en extrayant la protéine du gel et en analysant sa séquence par spectrométrie de masse. La faiblesse de cette méthode est qu'il faut sélectionner au préalable les protéines potentielles que l'on veut tester. La technique risque donc d'être longue si le nombre de candidats à tester est important. Ce genre d'expérience est davantage utile pour confirmer le substrat de PqsE mais non pour l'identifier. Une méthode alternative serait d'identifier les régulateurs interagissant avec la séquence lux présente dans la région promotrice de pqsA. Ceci peut être fait par pull-down ou par une mutagenèse aléatoire qui identifierait tous les régulateurs de pqsA.

Enfin, on peut envisager d'analyser la séquence promotrice des gènes les plus affectés dans un mutant pqsE, afin d'identifier des régions possiblement reconnues par des régulateurs transcriptionnels. Toutefois, il est difficile de distinguer dans le transcriptome du mutant pqsE les gènes directement activés par le régulateur contrôlé par PqsE de ceux qui découlent d'une conséquence ultérieure, telle que le stress oxydatif induit par la pyocyanine.

3.4.3.2.2 Lien entre PqsE et RhlR

RhlR est l'un des régulateurs de type LuxR sur lequel PqsE pourrait agir. Les trois seules publications dont PqsE est le sujet principal montrent toutes que sa fonction nécessite la présence de RhlR (Farrow et al., 2008; Hazan et al., 2010; Rampioni et al.,

2010). Mes résultats sont en accord avec eux, bien qu'il soit également clair qu'il existe de nombreuses différences entre un mutant $rhlR^-$ et un mutant $pqsE^-$, les plus marquantes étant la régulation de rhll, dépendante de RhlR (de Kievit et al., 2002) et indépendante de PqsE (Figure 3-55), ainsi que la virulence chez la souris, plus atténuée dans un mutant $pqsE^-$ par rapport au mutant $rhlR^-$ (Déziel et al., 2005).

3.4.3.2.2.1 PqsE et RhlR affectent différemment la transcription de l'opéron pqsABCDE, celle de mvfR et la production de DHQ

Le lien entre ces deux protéines se complexifie dans le cas de la régulation de *pqsA*. Les résultats présentés ici (

Figure 3-48, p. 260) ont également montré que RhlR et PqsE régulent tous deux de manière similaire l'expression de *mvfR* et de l'opéron *pqsABCDE*. J'ai néanmoins montré que leur effet sur ces deux transcriptions n'est pas tout à fait identique, et que RhlR possède une voie de régulation positive indépendante de PqsE sur *mvfR*. Mes résultats ne permettent toutefois pas de déterminer si l'action de PqsE se fait exclusivement *via* RhlR, ou si comme ce dernier, il possède des voies de régulation qui lui sont propres.

Nous avons publié que la surexpression de *pqsE* entraîne une diminution de la transcription de *pqsA* dans la souche sauvage, tel qu'attendu, tandis qu'une augmentation significative de celle-ci a été observée chez le mutant *rhlR*⁻, dans les mêmes conditions (Hazan *et al.*, 2010). Nous concluions ainsi que PqsE agit sur la transcription de *pqsA via* ce régulateur. A l'inverse, un autre article très récent sur PqsE démontre l'effet contraire : la surexpression de PqsE réprime la transcription de *pqsA*, en présence mais également en absence de RhlR (Rampioni *et al.*, 2010). Bien que l'augmentation (Hazan *et al.*, 2010) ou la diminution (Rampioni *et al.*, 2010) de transcription de *pqsA* chez le mutant *rhlR*⁻ surexprimant *pqsE* soit inexpliquée, cela indique néanmoins que PqsE a un effet sur cette transcription, même en absence de RhlR. Ceci démontre donc que PqsE possède elle aussi des voies de régulation indépendantes de celles de RhlR, au moins sur la transcription de *pqsA*.

3.4.3.2.2.2 Implication du C₄-HSL dans le lien entre PqsE et RhIR

Le lien entre PqsE et RhlR reste ambigu. Une autre étude (Farrow et al., 2008) a proposé que PqsE soit responsable de la « sensibilité » de RhlR au C₄-HSL. Cette étude a

démontré que dans un système d'expression hétérologue (*E. coli*), RhlR nécessite nettement moins d'auto-inducteur en présence de PqsE pour être activé, tandis que d'impressionnantes concentrations sont requises en son absence. Néanmoins, aucune explication n'a été fournie. Les résultats obtenus sur le lien entre PqsE et le C₄-HSL dans ce chapitre sont en accord avec ces observations. En effet, j'ai montré que cette molécule-signal nécessite la présence de PqsE pour activer la pyocyanine dans un mutant *lasR* (Figure 3-60, p. 275). PqsE semble donc permettre à la bactérie de percevoir les quantités physiologiques de C₄-HSL naturellement produites par la bactérie. Par contre, la même équipe de chercheurs a aussi rapporté que la production de pyocyanine était partiellement restaurée dans un mutant *rhlI* surexprimant *pqsE*, ce qui suggère que PqsE ne nécessite pas le C₄-HSL pour fonctionner.

Le C₄-HSL pourrait également intervenir dans la voie de répression de la pyocyanine que l'on cherche à identifier. En effet mes résultats ont montré que chez un mutant *lasR*, la production de pyocyanine est augmentée en présence de C₄-HSL (Figure 3-60 p. 275 et Figure 3-61 p. 276), tandis qu'une diminution est observée dans la souche sauvage, une fois le début de la phase stationnaire atteint (Figure 3-62, p. 277). Il est donc possible que le C₄-HSL soit impliqué dans la voie de régulation sur laquelle PqsE agit. Ceci pourrait être l'une des raisons pour lesquelles le criblage à la recherche du répresseur ciblé par PqsE n'a pas été fructueux. En effet, le C₄-HSL pourrait être un facteur commun entre la voie de répression et la voie d'activation de la pyocyanine. Ce chevauchement des voies de régulation empêche alors d'inactiver l'une des deux voies tout en conservant la seconde intacte. Le rôle exact de cet auto-inducteur sur la régulation de la pyocyanine devrait être étudié en profondeur, et le criblage pourrait par la suite être retenté, dans un milieu supplémenté en C₄-HSL, afin de pouvoir cibler d'autres facteurs impliqués dans la voie de répression de la pyocyanine sans pour autant affecter la voie d'activation.

L'hypothèse que je privilégie est que PqsE agit sur un facteur intervenant dans l'activité de RhlR, ou dans sa capacité à être activé par le C₄-HSL, du moins lors du contrôle de l'opéron *phz1*. Ce facteur pourrait être un régulateur de type LuxR, puisque certains sont connus pour former des hétérodimères avec RhlR (Ledgham *et al.*, 2003b). Ce régulateur ou ce facteur de régulation doit posséder un homologue chez *E. coli*,

puisque PqsE a affecté l'activité de RhlR dans ce système hétérologue (Farrow et al., 2008).

3.4.3.3 La cible de PqsE est un répresseur du quorum sensing contrôlé par LasR

Lors de l'étude sur le lien unissant PqsE et RhIR, j'ai découvert qu'un double mutant $lasR^*pqsE^-$ est capable de produire de la pyocyanine si l'on y exprime rhlR. Cette expérience est l'une des expériences-clé de mon projet, puisqu'avant celle-ci, aucune condition n'avait été identifiée permettant la production de pyocyanine en absence de pqsE. PqsE n'est donc pas directement nécessaire à l'activation des gènes de biosynthèse de la pyocyanine, mais agit probablement via un facteur de régulation. Puisque la pyocyanine peut être produite en absence de PqsE chez le mutant $lasR^-$, cela suggère que PqsE réprime un répresseur, et que ce dernier soit absent dans ce mutant. Le rôle de lasR aurait cette ambiguïté d'activer la voie de biosynthèse de la pyocyanine via RhIR, et d'autre part d'activer le répresseur de ces mêmes gènes. Un tel processus d'autorégulation ou de boucle de rétroaction négative est courant dans les systèmes de QS, et de régulation en général (Goulian, 2004; Mitrophanov & Groisman, 2008).

La Figure 3-78 présente la voie de régulation de la pyocyanine dépendante de PqsE et de RhlR et impliquant la présence d'un régulateur activé par LasR. Selon les expériences présentées dans ce chapitre, ce régulateur pourrait être un petit ARN. Il réprimerait une série de gènes impliqués dans le QS de *P. aeruginosa* tels que la pyocyanine, à l'instar des ARNnc rsmY et rsmZ, en se fixant sur l'ARN messager pour en bloquer la traduction ou pour favoriser sa dégradation. Lorsque PqsE est exprimée, elle dégrade ce petit ARN et lève donc la répression qu'il exerçait sur les nombreux gènes du QS. Ceci permettrait alors à RhlR d'activer ces gènes. En absence de LasR, ni le petit ARN ni RhlR ne sont exprimés. PqsE n'est plus nécessaire, puisque l'ARN qu'il dégrade n'est pas présent. En exprimant alors constitutivement rhlR, on obtient une production de pyocyanine, et ce même en absence de PqsE.

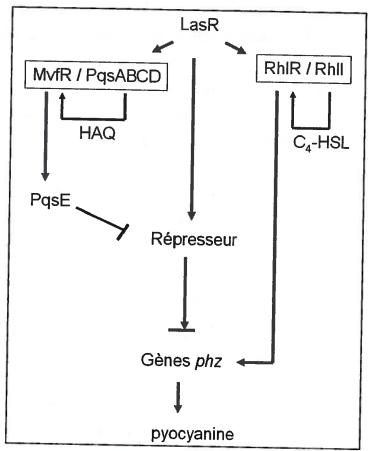


Figure 3-78. Schéma de régulation de la pyocyanine dépendante de PqsE et RhlR.

L'idée d'un répresseur de la pyocyanine contrôlé par LasR et sur lequel PqsE pourrait agir est appuyée par une autre expérience, qui a montré que la forte diminution de HHQ induite par la surexpression de pqsE chez la souche sauvage n'est pas observable chez un mutant $lasR^-$ (Figure 3-66, p. 283). Ceci peut s'expliquer par le fait que chez ce mutant, la cible directe de PqsE est absente. Il serait utile de confirmer cela en suivant également la transcription de pqsA par qRT-PCR chez les mutants $lasR^-$ et $lasR^-pqsE^-$. En effet, l'absence de pqsE induit en général une augmentation de la transcription de l'opéron pqsABCDE. Si l'hypothèse selon laquelle PqsE agit sur un répresseur contrôlé par LasR est vraie, l'absence de pqsE dans un mutant $lasR^-$ ne devrait pas affecter la transcription de l'opéron.

Afin de confirmer que le répresseur ciblé par PqsE est contrôlé positivement par LasR, l'effet de la surexpression de ce dernier a été étudié. En effet, celle-ci devrait induire la surexpression du répresseur. Les vecteurs pUCPSK*lasR* et pMTl ont été

utilisés pour surexprimer *lasR*. Ils induisent tous deux la production de 3-oxo-C₁₂-HSL chez un mutant *lasR*, ce qui confirme leur identité. Ils ne génèrent toutefois pas une influence similaire sur la production de pyocyanine chez ce mutant, puisque le premier l'inhibe et que le second l'active. Il serait nécessaire de quantifier la production de 3-oxo-C₁₂-HSL afin de déterminer si l'un des vecteurs exprime davantage *lasR* que le second, ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus.

Selon les données transcriptomiques obtenues pour un double mutant *las l' rhll*, il existe près d'une vingtaine de régulateurs transcriptionnels contrôlés par les systèmes Las et Rhl (Wagner *et al.*, 2003). Plus spécifiquement, dans un mutant *las R*, l'expression de quatre régulateurs transcriptionnels est modifiée (Rasmussen *et al.*, 2005). Le plus étudié de ceux-ci est le répresseur RsaL. Celui-ci réprime directement les gènes de biosynthèse de la pyocyanine (Rampioni *et al.*, 2007; Rampioni *et al.*, 2009), et un double mutant *rsaL pas E* parvient à produire de la pyocyanine dans certaines conditions (Figure 3-64C, p. 280). Toutefois, RsaL réprime énormément la production de 3-oxo-C₁₂-HSL, qui n'est pas affectée du tout dans un mutant *pas E*. De plus, j'ai démontré que surexprimer Pas E dans un mutant *rsaL* menait à une diminution de HHQ, tout comme chez la souche sauvage, ce qui n'est pas le cas chez un mutant *las R* (Figure 3-66, p. 283). Ainsi j'ai pu montrer que Pas E est encore fonctionnelle chez un mutant *rsaL* et que donc elle n'agit pas sur ce répresseur. Ce résultat montre également que la régulation des HAQ et celle de la pyocyanine par Pas E se fait par un facteur contrôlé par Las R. On peut supposer qu'il s'agisse du même facteur dans les deux cas.

Parmi les autres régulateurs contrôlés par LasR, l'un d'eux est codé par le gène PA2588. PA2588 possède des homologies avec le régulateur transcriptionnel VqsM (Wagner et al., 2007). Il n'affecte pas la production de C₄-HSL mais régule positivement de nombreux gènes contrôlés par RhlR (Wagner et al., 2007). Selon ces données, PA2588 est davantage un activateur qu'un répresseur et n'est donc pas une bonne cible pour PqsE. Les régulateurs de type LuxR appelés VqsR (PA2591) et QscR sont directement activés par LasR (Li et al., 2007), agissent davantage comme répresseurs mais affectent la production des AHL (Wagner et al., 2007). Si PqsE bloquait leur activation, la production d'AHL en serait donc affectée, ce qui n'est pas le cas. Selon les données transcriptomiques, la transcription d'aucun régulateur ne serait augmentée en absence de

LasR (Rasmussen et al., 2005). En conclusion, tous les répresseurs connus du QS, y compris ceux contrôlés par LasR, influencent la production des AHL (Williams & Camara, 2009), au contraire de PqsE.

3.4.3.4 Le répresseur hypothétique est exprimé tardivement dans un mutant lasR⁻

L'une des questions abordées au cours de ce projet était la raison pour laquelle un mutant $lasR^-$ exprimant rhlR produit de la pyocyanine en absence de PqsE, mais en produit significativement plus lorsque ce dernier est présent. J'ai montré que le répresseur hypothétique que je cherche à identifier serait tout de même exprimé dans un mutant $lasR^-$, mais seulement en fin de phase stationnaire (Figure 3-67, p. 284), comme c'est le cas de beaucoup de facteurs connus pour être régulés par celui-ci (Dekimpe & Déziel, 2009). En effet, un mutant $lasR^-$ produira de la pyocyanine tardivement (Dekimpe & Déziel, 2009), tandis que le double mutant $lasR^-pqsE^-$ n'en produira jamais, ce qui démontre que PqsE est toujours nécessaire chez ce mutant pour la production de pyocyanine, mais uniquement en fin de phase stationnaire. Ce serait pour cette raison qu'un double mutant $lasR^-pqsE^-$ exprimant rhlR produit moins de pyocyanine qu'en présence de PqsE, car ce dernier reste nécessaire pour dégrader le répresseur exprimé en fin de phase stationnaire dans un mutant $lasR^-$ pour ainsi permettre de continuer à produire de la pyocyanine. Ces résultats démontrent également que LasR ne peut pas être le répresseur sur lequel PqsE agit.

3.4.3.5 PqsE a des homologues chez plusieurs espèces de Burkholderia

Afin de toujours mieux caractériser le substrat de PqsE, d'autres propriétés peuvent lui être ajoutées. Il est probable que le substrat de PqsE ait un homologue chez certaines espèces du genre *Burkholderia*. En effet, plusieurs de ces espèces possèdent un homologue à PqsE codé sur opéron homologue à *pqsABCDE* (Vial et al 2008), et l'alignement de ces différents homologues avec PqsE démontre que les motifs impliqués dans le site catalytique et dans la liaison avec les métaux sont très conservés et correspondent aux domaines des métallo-hydrolases. On peut donc supposer que ces homologues soient fonctionnels. Cette hypothèse est appuyée par une étude montrant que

l'homologue de PqsE de *B. pseudomallei* parvient à complémenter un mutant *pqsE* de *P. aeruginosa*, ce qui suggère que l'homologue est fonctionnel et remplit la même fonction chez les deux genres bactériens (Diggle *et al.*, 2006b). Toutefois, aucune étude ne s'est encore penchée sur le rôle des homologues de PqsE (appelés HmqE) chez *Burkholderia*. Il n'y a donc à ce jour aucune preuve que celui-ci ait la même fonction chez cette espèce.

3.4.3.6 Le substrat de PqsE doit être un petit ARN régulateur

Si l'on reconsidère la totalité des propriétés caractérisant le substrat de PqsE, celuici doit être hydrolysable, intracellulaire exclusivement, de taille petite ou au moins de forme allongée, il doit posséder un homologue fonctionnel chez *E. coli*, et chez certaines espèces de *Burkholderia*, doit avoir un rôle de répresseur, être contrôlé par le régulateur transcriptionnel LasR et doit être impliqué dans le QS. Ces caractéristiques sont toutes reprises dans le Tableau 3-12, p. 323. D'après moi, une seule catégorie de molécules répond à tous ces critères : les ARNnc. Tableau 3-12. Liste des caractéristiques du substrat de PqsE.

Caractéristiques	Preuve	Référence
hydrolysable	PqsE appartient à la famille des métallo-hydrolases	Ce document
intracellulaire	Aucune complémentation extracellulaire possible pour le mutant pqsE	Ce document
Petit ou allongé	Forme de la poche catalytique de PqsE	(Yu et al., 2009)
Homologue chez E. coli	PqsE est actif dans cette espèce en présence de RhlR et de C ₄ -HSL	(Farrow et al., 2008)
Homologue chez Burkholderia pseudomallei	fonctionnel chez cette espèce	(Diggle et al., 2006b)
Codé par une petite séquence	Non identifié après un criblage de 400 000 colonies	Ce document
Rôle de régulateur	Affecte plus de 300 gènes	(Hazan <i>et al.</i> , 2010; Rampioni <i>et al.</i> , 2010)
Rôle de répresseur	Certains mutants pqsE produisent de la pyocyanine en présence d'une mutation supplémentaire	Ce document
Contrôlé par LasR	PqsE n'est pas nécessaire pour produire de la pyocyanine en absence de LasR	Ce document
Impliqué dans le QS	Une grande partie des gènes affectés par PqsE sont contrôlés par le QS	(Hazan <i>et al.</i> , 2010; Rampioni <i>et al.</i> , 2010)

3.4.3.6.1 Une activité phosphodiestérase pour PqsE

L'hypothèse du petit ARN régulateur est appuyée entre autres par le fait qu'une activité phosphodiestérase sur l'ADN et l'ARN messager a été démontrée en utilisant la protéine PqsE purifiée (Yu et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont toutefois suggéré que cette activité ne devait pas être la fonction primaire de PqsE, étant donné la lenteur de la dégradation des molécules d'acides nucléiques. Toutefois, il est tout à fait possible que PqsE dégrade spécifiquement certains ARNnc, ce qui expliquerait sa faible efficacité sur des molécules d'ARN ou d'ADN aléatoires. Des métallo-hydrolases telles que les RNases E et les RNases Z sont connues pour dégrader les acides nucléiques (Cormack et

al., 1993; Even et al., 2005; Perwez & Kushner, 2006), et il est notable que les meilleures homologies de séquences avec PqsE se font avec des protéines métabolisant l'ARN. Néanmoins ces enzymes sont connues pour lier exclusivement le zinc et non le fer (Dominski, 2007; Vogel et al., 2002), à la différence de PqsE (Yu et al., 2009). L'une des phosphodiestérases étudiées, appelée ElaC, fixe autant le zinc que le fer, mais ne semble exercer son activité de phosphodiestérase uniquement en complexe avec le zinc. La substitution du zinc pour un autre métal tel que le magnésium, le manganèse ou le fer réduit fortement l'activité de cette enzyme (Vogel et al., 2002). Étant donné les caractéristiques uniques de PqsE, il n'est toutefois pas impossible qu'elle fasse partie d'une nouvelle famille de RNases.

3.4.3.6.2 L'ARN régulateur potentiellement dégradé par PqsE n'est pas encore connu

Les ARNnc sont connus pour affecter le QS, et agissent la plupart du temps comme répresseurs. Ces petits ARN se fixent sur des ARN messagers ou sur des protéines pour généralement diminuer leur stabilité ou empêcher leur fonctionnement. Les ARNnc du QS de *P. aeruginosa* déjà identifiés sont *rsmY* et *rsmZ* (Kay *et al.*, 2006). Ceux-ci ne sont pas des substrats potentiels de PqsE puisqu'ils sont connus pour affecter la production d'AHL (Kay *et al.*, 2006).

De récentes études ont démontré que *P. aeruginosa* possède de nombreux petits ARN encore non caractérisés (Gonzalez *et al.*, 2008; Livny & Waldor, 2007; Sonnleitner *et al.*, 2008), tous découverts par des techniques de bioinformatique. Néanmoins les critères utilisés pour les identifier ne correspondent pas à ceux nécessaires pour isoler le substrat de PqsE. Ces études se basent entre autres sur les séquences intergéniques conservées chez plusieurs espèces de *Pseudomonas*. Ce critère ne peut pas être pris en compte pour ce projet, puisque chez ce genre bactérien, les données disponibles indiquent que seul *P. aeruginosa* possède un homologue de PqsE. Rien ne garantit donc que les souches sans PqsE aient conservé cet éventuel ARN régulateur. De nouveaux critères spécifiques à la recherche ont donc été mis au point. Des régions intergéniques conservées chez plusieurs espèces possédant un homologue à PqsE et absentes dans les autres espèces de *Pseudomonas* ou de *Burkholderia* ont été sélectionnées mais aucun

alignement n'a été significatif. Ceci est probablement dû au fait que les ARNnc conservent davantage leur structure secondaire que leur structure primaire. Le meilleur exemple est l'ARN ryhB, un petit ARN contrôlé par le régulateur Fur impliqué dans le métabolisme du fer chez E. coli. Aucun homologue de séquence n'a été identifié chez P. aeruginosa, mais deux homologues fonctionnels, prrF1 et prrF2, ont un rôle identique à celui de ryhB, chez P. aeruginosa (Wilderman et al., 2004). Il faut également souligner que l'absence de PqsE dans une souche n'est pas une garantie que l'ARN régulateur sur lequel il agit soit également absent. Les critères utilisés ont peut-être été trop rigoureux.

A présent que l'on sait que l'ARNnc recherché est contrôlé par LasR, il serait judicieux d'exploiter ces connaissances pour raffiner les recherches. Il faudra identifier les régions intergéniques possédant un terminateur rho-indépendant mais également une séquence Las. Par contre, cette approche ne sera fructueuse que si l'ARNnc est directement activé par LasR, ce qui n'a pas été encore déterminé.

Les données transcriptomiques ne permettent pas non plus d'identifier une région intergénique exprimée en absence de PqsE, dégradée en sa présence et absente dans un mutant *lasR*. En effet les biopuces Affymetrix généralement utilisées pour l'étude transcriptomique de *P. aeruginosa* ne possèdent qu'une faible représentation des régions intergéniques contenues dans son génome. De plus, la densité cellulaire à laquelle l'étude est réalisée est importante, puisque selon mes résultats le répresseur ne sera dégradé qu'une fois PqsE présente, c'est-à-dire vers une DO600 de 4e.

3.4.3.6.3 Techniques d'identification de l'ARN régulateur que PqsE pourrait dégrader

3.4.3.6.3.1 Identification par mutagenèse aléatoire

Si le substrat de PqsE est un petit ARN, cela explique la raison pour laquelle il n'a pas été identifié lors du premier criblage de 40 000 colonies. Un second criblage de 400 000 colonies a été ajouté au projet, mais aucune mutation n'a permis d'identifier la cible de PqsE. Ceci peut être dû à la présence de « points chauds » et de « points froids », c'est-à-dire à certaines régions plus ou moins favorables à l'insertion de transposon au sein du génome (Jacobs *et al.*, 2003). Il est évident que la difficulté de l'identification

d'un petit ARN par mutagenèse aléatoire est directement proportionnelle à la taille de la cible visée. Des tests ont été réalisés afin d'augmenter le contraste possible entre l'expression des gènes de biosynthèse de la pyocyanine en présence ou en absence de PqsE. Si le répresseur que je cherche à identifier est activé par LasR, la surexpression de ce dernier pourrait favoriser l'identification de mutants du répresseur. Une autre possibilité serait de surexprimer rhlR chez la souche pqsE. Le rapporteur transcriptionnel sera donc fortement activé par RhlR, mais uniquement lorsque le répresseur sera absent. Ces tests ont été réalisés avec le rapporteur phzA1-lacZ et n'ont pas augmenté le contraste entre PA14 et pqsE surexprimant l'un ou l'autre de ces régulateurs. Des tests identiques utilisant le rapporteur phzA1-lux sont en cours au sein du laboratoire et devraient être plus prometteurs, étant donné sa faible expression de base.

3.4.3.6.3.2 Identification par hybridation soustractive

L'alternative choisie à la mutagenèse aléatoire pour identifier le petit ARN régulateur est la technique du SCOTS. Celle-ci est adéquate pour identifier les gènes différentiellement exprimés mais n'a jamais été utilisée pour l'identification d'ARNnc. Néanmoins les tests préliminaires ont montré qu'elle pouvait s'appliquer à ce genre de cibles. Cette découverte pourrait faire l'objet d'un article présentant la méthode et les ajustements nécessaires pour identifier les ARNnc, domaine très actuel dans le monde de la biologie.

Parmi les ADNc codés exclusivement sur des régions intergéniques et uniquement exprimés chez le mutant $pqsE^-$, il est intéressant d'observer une certaine redondance. En effet, 4 des 8 régions identifiées l'ont été plus d'une fois. Sur les 8 séquences, l'une d'entre elles (IR_434) contient un petit ARN non codant identifié dans l'un des articles récents sur la découverte d'ARNnc chez P. aeruginosa (Gonzalez et al., 2008) et a de plus été identifiée à deux reprises par le SCOTS. Par contre, aucune région identifiée ici n'est également présente dans les 17 régions contenant un ARNnc publiées par Livny et ses collègues (Livny et al., 2006). L'étude de la correspondance entre les régions intergéniques de PA14 et de PAO1 montre qu'au moins trois régions intergéniques identifiées par le SCOTS n'ont pas d'équivalent chez PAO1 et que seulement deux d'entre elles se situent dans des régions similaires entre les deux souches. Ces fortes

différences pourraient contribuer à expliquer le peu de chevauchement entre les études sur PAO1 et celles avec PA14 au sujet de leurs régions intergéniques.

3.4.3.6.4 Mode d'action du petit ARN régulateur

Les ARNnc peuvent avoir différents modes d'action, et interagir soit sur des ARNm, soit sur des protéines. La voie de régulation proposée au point précédent illustre une action directement sur les ARNm que l'ARNnc régule. La possibilité d'une interaction entre l'ARN répresseur et RhlR reste aussi plausible, puisqu'il pourrait encore affecter cette protéine en s'y fixant directement. Néanmoins, le chevauchement seulement partiel entre le régulon de RhlR et celui du système MvfR/PQS/PqsE suggère plutôt que l'ARNnc puisse affecter une protéine qui s'associe avec RhlR. La dimérisation entre RhlR et cette seconde protéine induirait un régulon spécifique, commun à RhlR et à PqsE. Cette dimérisation pourrait être bloquée ou non fonctionnelle en présence de l'ARNnc. Les protéines de type LuxR sont connues pour former des hétérodimères afin de raffiner leurs voies de régulation, bien qu'en général ce processus mène à une régulation négative (Ledgham et al., 2003b; Zhu & Winans, 2001). Cette hypothèse reste à être éprouvée.

3.4.3.6.5 Intégration du rôle du C_4 -HSL dans le modèle de régulation de la pyocyanine

L'intérêt de ce modèle est qu'il réunit la totalité des conclusions apportées lors des différentes expériences liées à PqsE. Pour la première fois, une hypothèse semble expliquer tous les résultats obtenus, à l'exception notable de certains tels que le rôle du C₄-HSL dans cette voie de régulation. Pour rappel, mes résultats ainsi que de récents travaux (Farrow et al., 2008) suggèrent que PqsE pourrait « sensibiliser » la cellule au C₄-HSL. Ce lien de plus en plus confirmé entre PqsE et le C₄-HSL, ainsi que le chevauchement entre le régulon de RhIR et celui du système MvfR/PQS/PqsE devra être étudié plus en profondeur. RhIR forme des homodimères et se lie à certains promoteurs en présence mais également en absence de son auto-inducteur (Medina et al., 2003c; Ventre et al., 2003). La fixation de RhIR sur le promoteur de rhIAB en absence de C₄-HSL génère une légère baisse de la transcription de ces gènes, ce qui suggère que RhIR

en absence de ligand pourrait avoir une fonction de répression (Medina et al., 2003c). On aurait pu imaginer que le régulon de RhlR associé au C₄-HSL puisse correspondre au régulon de MvfR/PQS/PqsE. Toutefois, la Figure 3-68 (p. 285) montre que surexprimer rhlR dans un mutant las \(\text{i} \) induit une production de pyocyanine, ce qui signifie que les gènes de biosynthèse de celle-ci, contrôlés par PqsE, ne nécessitent par le C₄-HSL pour être activés. Le régulon de PqsE ne correspond donc pas au régulon de RhlR lorsqu'il est associé à son auto-inducteur. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour intégrer le C₄-HSL dans le modèle de régulation de PqsE via un ARNnc répresseur contrôlé par LasR.

3.4.3.6.6 Implication de Hfq sur l'ARN régulateur recherché

La protéine Hfq est une chaperonne impliquée dans la stabilisation de nombreux petits ARN non codants dont le mode d'action est de s'associer avec des ARNm (Wassarman et al., 2001). Son lien avec les ARNnc a été souvent exploité dans la recherche et l'identification de nouveaux petits ARN (Lenz et al., 2004; Sonnleitner et al., 2008; Zhang et al., 2003).

Dans l'hypothèse où l'ARN répresseur que je cherche est stabilisé par Hfq, un mutant hfq^- pourrait dégrader l'ARN répresseur plus rapidement. Le phénotype d'un mutant hfq^- ne peut pas confirmer cette hypothèse, car cette chaperonne est impliquée dans de nombreuses voies de régulation impliquant entre autres celle du régulateur RpoS (Sonnleitner et al., 2006). Sa croissance est affectée et il présente une réduction de virulence (Sonnleitner et al., 2003). Par contre, si l'ARN répresseur est plus facilement dégradé en absence de Hfq, la présence de PqsE ne devrait plus être essentielle dans ce mutant. Pour le vérifier, il aurait été intéressant de générer un double mutant $hfq^ pqsE^-$ afin de déterminer si cette souche produirait encore de la pyocyanine. Toutefois, la mutation dans hfq risque de générer de nombreux autres phénotypes qui pourraient affecter l'interprétation des résultats.

3.4.3.6.7 Application de l'hypothèse de l'ARN régulateur pour expliquer les phénotypes des mutants 5.79 et 10.41

La thèse de l'ARNnc dégradé par PqsE peut même donner des avenues de compréhension sur les phénotypes inexplicables des mutants 10.41 et 5.79, déficients dans l'expression de l'opéron *pqsABCDE*, ne produisant aucun HAQ mais synthétisant autant de pyocyanine que la souche sauvage (voir pages 88 et 92). Selon le schéma de régulation de la pyocyanine présenté ici (Figure 3-78, p. 319), il se peut que ces mutants n'expriment plus l'ARN régulateur que je cherche à identifier.

Le mutant 5.79 possède deux mutations. L'une d'entre elles est localisée dans le gène pqsL, tandis que l'autre n'a pas pu être séquencée, bien que tout porte à croire qu'elle affecte l'opéron pqsABCDE. Le mutant 10.41 est le seul mutant pqsA capable de produire de la pyocyanine. Les points communs entre ces deux mutants est de posséder une mutation dans l'opéron, de ne plus produire aucun HAQ, mais de synthétiser autant de pyocyanine que la souche sauvage. Ce phénotype était inexplicable, car l'expression de l'opéron et plus particulièrement de pqsE était considérée comme absolument requise pour produire de la pyocyanine. Toutefois, l'hypothèse du petit ARN répresseur suggère qu'un mutant puisse à présent ne pas exprimer PqsE tout en étant capable de produire de la pyocyanine, à condition de ne pas exprimer le répresseur ciblé par PqsE. Se pourrait-il que ces deux souches possèdent une mutation dans ce répresseur ? J'avais suggéré que ce dernier puisse être codé de manière antisens au gène pqsA. Toutefois, de nombreux mutants pqsA, dont les insertions transpositionnelles sont très proches de celle du mutant 10.41, ne présentent pas ce même phénotype. De plus, une mutation spécifique de pqsEajoutée dans ce mutant abolit complètement la production de pyocyanine, ce qui démontre que PqsE reste tout à fait nécessaire à l'expression de la pyocyanine dans ce mutant. L'explication la plus plausible est que la mutation de l'opéron dans ces deux mutants est non polaire, et que l'expression de PqsE n'en est pas affectée. Bien qu'une insertion de transposon génère des mutations supposées polaires, de nombreux cas semblables ont été observés lors des mutations générées dans l'opéron, ce qui me porte à requestionner le statut d'opéron pour les gènes pqsABCDE (voir section 3.4.3.1.4, p. 312). La position de la mutation supplémentaire dans ces deux mutants reste donc à être identifiée.

3.4.4 Conclusion du projet

Après plus de cinq années consacrées à l'étude du rôle de PqsE dans la régulation du QS chez *P. aeruginosa*, plusieurs avancées importantes ont été réalisées. La découverte la plus importante est que PqsE n'est pas strictement essentielle pour produire de la pyocyanine. Qu'un double mutant *lasR-pqsE-* surexprimant *rhlR* puisse être capable d'en produire démontre que PqsE doit avoir un rôle dans la dégradation ou l'inactivation d'un répresseur et que ce dernier est contrôlé par LasR.

Bien qu'une preuve formelle n'ait pas encore été établie, la déduction que PqsE puisse agir sur un petit ARN régulateur est également déterminante. Celle-ci est appuyée par la vaste majorité des expériences réalisées durant ma thèse de doctorat. L'étude du lien entre PqsE et les ARNnc n'en est qu'à son ébauche mais s'avère très prometteuse. De nombreuses séquences intergéniques présentes uniquement en absence de PqsE ont été identifiées par une nouvelle application de la méthode d'hybridation soustractive appelée SCOTS. Celles-ci sont en cours d'étude afin de déterminer leur lien éventuel avec PqsE.

Ces travaux ont mené à la publication d'un article en collaboration avec le laboratoire de la Dre L. G. Rahme, et le lien entre PqsE et les petits ARN pourrait aboutir à une publication de méthode ainsi qu'à une publication sur le rôle de PqsE, si sa cible est identifiée.

PqsE reste encore à ce jour l'une des protéines les plus uniques dans le QS de P. aeruginosa. Une fois son substrat identifié, ce sera probablement une nouvelle voie de régulation exceptionnelle qui devra être caractérisée. Le caractère singulier de PqsE en tant qu'hydrolase fixant le fer n'appartenant à aucune sous-famille connue fait d'elle un domaine qui ne cessera de passionner les chercheurs pour encore de nombreuses années.

Conclusion générale

L'objectif à long terme de ces travaux est de mieux comprendre la régulation des gènes de virulence chez *P. aeruginosa* et d'étudier les facteurs essentiels à l'expression de ceux-ci, tels que les régulateurs LasR et RhlR (étudiés au Chapitre 1), les moléculessignal du système MvfR-PQS (Chapitre 2) et la protéine PqsE (Chapitre 3). Mes travaux ont montré que le lien hiérarchique unissant LasR et RhlR est plus complexe qu'il n'y paraît, et que RhlR parvient à contrebalancer une déficience de LasR en activant le régulon de ce dernier en son absence. J'ai également apporté des éclaircissements sur la voie de biosynthèse des molécules-signal du système MvfR/PQS/PqsE, en démontrant l'existence de composés intermédiaires et en déterminant la séquence fonctionnelle des enzymes PqsA, PqsB, PqsC et PqsD. J'ai également caractérisé certains phénotypes liés à ces molécules-signal, dont le rôle du HHQ et du HQNO dans l'apparition du phénotype d'iridescence et d'autolyse chez *P. aeruginosa*. Enfin, j'ai apporté plusieurs éclaircissements quant au rôle de PqsE et aux liens possibles qui l'unissent avec un ARNnc répresseur contrôlé par LasR et avec le système RhlR et son auto-inducteur, le C4-HSL.

La science fondamentale telle que celle réalisée dans ce projet est nécessaire pour offrir une base solide sur laquelle s'appuieront d'autres recherches, visant à trouver des molécules capables d'inhiber ces facteurs. Le but ultime justifiant tous ces efforts est d'améliorer les stratégies visant à lutter contre les infections à *P. aeruginosa*. Cibler non pas la survie des bactéries mais bien les voies régissant l'expression de leur virulence devrait empêcher l'apparition du phénomène de résistance propre à l'utilisation des antibiotiques (Bjarnsholt & Givskov, 2007). Elle ouvre donc les portes à de nouvelles alternatives prometteuses qui permettront de limiter la consommation excessive d'antibiotiques, devenue problématique de nos jours.

Appendices

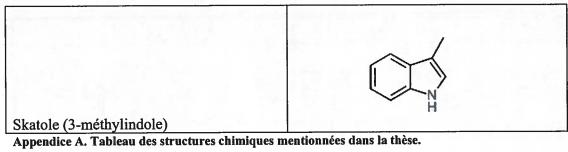
Appendice A

Tableau des structures chimiques mentionnées dans la thèse et utilisées dans l'étude de la biosynthèse des HAQ

Tableau des structures chimiques mentionnées dans la thèse

Tableau des structures chimiques mentionnée	
Nom de la molécule	Structure chimique
	NH ₂
2-amino acétophénone	
2-bromo-N-(3-fluorophényl) acétamide	N C Br
	OU
4-Hydroxyquinoline	OH N
acide 4-chloro-2-amino-benzoïque (4-CABA)	OH NH ₂
Acide kynurénique	ОН
acide-2-bromo-octanoïque	ОН
asias 2 promo octanoido	

acide-2-octynoïque	ОН
acide-6-fluoro-2-amino-benzoïque (6-FABA)	OH NH ₂
anthranoïl anthranilate	NH ₂ CH ₃
indole	
Indole acide acétique	OH N N H
N-formyl 2-amino acétophénone	СНО



Appendice B

Liste des souches utilisées dans ce document

Appendice B. Liste des souches utilisées dans ce document.

Espèce bactérienne	Nom	Numéro de collection dans le laboratoire	Description	Référence
Pseudomonas aeruginosa	PAK	Réserve B2T68	souche parentale, ATCC 33354	(Bradley, 1974)
	PA14	ED14	isolat clinique UCBPP- PA14, souche parentale	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
	G33	ED417	ED36 contenant une mutation au sein du gène rsaL, Gm ^r	Laboratoire L.G. Rahme
15	G49	ED418	ED36 contenant une mutation dans le promoteur du gène <i>rsaL</i> , Gm ^r	Laboratoire L.G. Rahme
	lasī	ED296	mutant PA14_45940 (<i>lasl</i>) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.h arvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
lasR ⁻	lasR⁻	ED69	mutant <i>lasR</i> *::Gm dérivé de PA14	(Déziel et al., 2004)
	lasR ⁻ pqsE	ED247	mutation <i>lasR</i> :: Gm intégrée dans ED36	laboratoire E. Déziel
	lasR ⁻ rhIR ⁻	ED266	Double mutant <i>rhIR</i> ::Tc et <i>lasR</i> ::Gm dérivé de PA14	(Dekimpe & Déziel, 2009)
	PA4500	ED462	mutant PA14_58390 (PA4500) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
	PA1221	ED465	mutant PA14_48530 (PA1221) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
	PA1217	ED475	mutant PA14_48570 (PA1217) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
	PA1214	ED441	mutant PA14_48610 (PA1214) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
	PA4496-1	ED442	mutant PA14_58350 ID33142 (PA4496) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)

	·		
PA4496-2	ED454	mutant PA14_58350 ID41087 (PA4496) provenant de la banque non redondante de mutants de PA14, Gm ^r	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 CTX- phzA1-lacZ	ED231	souche PA14 possédant le phzA1-lacZ dans son site attb	ce document
PA14 CTX- phzA1-lux	ED559	souche PA14 possédant phzA1-lux dans son site attb	ce document
PA14 ::phzA 1-lacZ	ED245	ED231 flippé avec FLP2	ce document
PA14 ::phzA 1-lux	ED561	ED559 flippé avec FLP2	ce document
PAO-P4	ED313	Mutant Tn5-B21 lasR dérivé de la souche sauvage PAO1 lecA::lux	(Diggle et al., 2002)
phzC1 ⁻ C2 ⁻	ED85	mutation du gène phzC1 et phzC2 par échange allélique au moyen du vecteur pEX18Ap	Labo É. Déziel
phzM ⁻	ED120	mutant phzM::Gm	Labo Pierre Cornélis, Bruxelles, Belgique
pqsA ⁻	ED37	Insertion du transposon Tn <i>phoA</i> dans le gène <i>pqsA</i> , Kan ^r	Banque de mutants de PA14
pqsA non polaire	ED83	délétion non polaire du gène <i>pqsA</i>	Gaoping Xiao, labo L.G. Rahme
pqsA ⁻ pqsH	ED170	pqsA contenant une cassette aacC1 insérée dans le gène pqsH; Gm ^r , Km ^r	(Xiao et al., 2006a)
pqsA ⁻ VD10.41	ED553	insertion du transposon IS/acZ dans le gène pqsA de la souche PA14	ce document
pqsB ⁻	ED117	Insertion du transposon TnphoA dans le gène pqsB	(Mahajan-Miklos <i>et al.</i> , 1999)
pqsC	ED04	mutant pqsC::Gm provenant de la banque non redondante de mutants de PA14	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
pqsC non polaire	ED218	remplacement d'une partie du gène <i>pqsC</i> par une cassette de résistance Kan ^r	(Lesic & Rahme, 2008)
pqsD*	ED690	remplacement d'une partie du gène pqsD par une cassette de résistance Kan ^r	Meenu Kesarwani, labo L.G. Rahme
pqsE	ED36	délétion de 570 paires de	(Déziel et al., 2004)

1		T	hases dans lo gòno ngo	
	pqsE ::CTX- phzA1-lacZ	ED232	bases dans le gène pqsE mutant pqsE possédant le transposon mini-CTX- phzA1-lacZ dans son site attb, Tc ^r	ce document
	pqsE ::CTX- phzA1-lux	ED560	mutant pqsE possédant le transposon mini-CTX-phzA1-lux dans son site attb, Tc ^r	ce document
	pqsE :: phzA1-lacZ	ED246	ED232 flippé avec FLP2	ce document
	pqsE phzA1- lux	ED562	ED560 flippé avec FLP2	ce document
	pqsH	ED139	Insertion de la cassette aacC1 dans le gène pqsH de la souche PA14, Gm ^r	(Xiao et al., 2006a)
	pqsL ⁻	ED67	Délétion du gène pqsL chez la souche PA14	(Lépine et al., 2004)
	pqsL ⁻ VD5.79	ED719	insertion inconnue du transposon ISlacZ chez la souche ED67	ce document
	qscR ⁻	ED248	insertion du vecteur pNTPS138 dans le gène qscR de la souche PA14	ce document
	rhll-		mutant PA14_19130 (rhll) p non redondante de mutants	rovenant de la banque
	rhIR ⁻	ED68	mutant <i>rhIR</i> ::Tc dérivé de PA14	(Déziel et al., 2005)
	rsaL	ED09	mutant <i>rsaL</i> ::Gm provenant de la banque non redondante de mutants de PA14	http://ausubellab.mgh.ha rvard.edu/cgi- bin/pa14/publications.cgi (Liberati <i>et al.</i> , 2006)
Staphylococcus aureus	souche Newman	ED94	souche de laboratoire	ATCC 25904
Chromo- bacterium violaceum	CV026	ED743	mini-Tn5 mutant de Chromobacterium violaceum ATCC 31532, Kan ^r	(Latifi et al., 1995; Winson et al., 1995)
Escherichia coli	DH5α	ED78	supE44 lacU169 (80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(Hanahan, 1983)
	S17-1	ED221	E. coli S17-1 (λpir). F- recA, hsdR, RP4-2	(Simon et al., 1983)
	SM10	ED222	thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km Apir	(Simon et al., 1983)
	JM109	ED26	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac- proAB) e14- [F' traD36 proAB+ laclq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
	χ 7213	ED743	thi thr leu tonA lacY supE recA RP4 2-Tc:: Mu [Apir]	(Daigle <i>et al.</i> , 2001)

1		Kmr ∆asdA4	

Lorsque non spécifié, les mutants sont générés à partir de la souche sauvage de P. aeruginosa PA14.

Appendice C

Liste des amorces utilisées dans ce document

Nom de l'amorce	Région amplifiée	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation (°C)	Motifs ajoutés	Cámuna.
pqsEpMNTAPF	gène <i>pqsE</i>			site Xbal	Séquence GC TCT AGA ATG TTG AGG CTT TCG GCT C
pqsEpMNTAPR	gène <i>pqsE</i>	938	62	site <i>Hind</i> III	
qscRpNTPS138 F qscRpNTPS138	partie du gène qscR de PA14, pour clonage dans		55	site Hindlil	CCC AAG CTT AAT GGA TGT CCC GTC TCA G TCTCAAGCTTTGACCGCGCCTAAATATCAT
R R	pNPTS138	419	55	site <i>Eco</i> RI	TCGAATTCCCACTTGAGCATCTCGGTTT
ОррF	promoteur phzA1- lacZ de PA14		55	site Xhol	TCTCTCTCGAGCATTTCCGTAACCCGAGAAG
OppR		700	55	site Pstl	TTCCTGCAGGAGGGGTGTTTCCCTGTACC
VDrsmZextF	rsmZ	140	55	amorces externes	ACTCCTGCGTACAGGGAACA
VDrsmZextR	-16-4		55		AGTAAAACGGCAGGCAAAAA
VDaleatoireN	aléatoire (amorce NKPN1 de France Daigle) pour transcription inverse	1	60	étiquette pour SCOTS (pqsE)	GTGGTACCGCTCTCCGTCCGANNNNNNNN
VDscotsN	amplification avec l'étiquette des amorces VDaleatoirePA14	,	55	amplif du cDNA obtenu avec les amorces VDaleatoireN	GTGGTACCGCTCTCCGTCCGA

VDaleatoirePA1 4	aléatoire (amorce RB1 de France Daigle) pour transcription inverse	1	60	étiquette pour SCOTS (PA14)	CGGGATCCAGCTTCTCACGCANNNNNNNNN
VDscotsPA14	amplification avec l'étiquette des amorces VDaleatoirePA14	I	55	amplif du cDNA obtenu avec les amorces VDaleatoirePA14	CGGGATCCAGCTTCTCACGCA
VDriboF	amplification des opérons d'ARN		55		GGAGACCCCACACTACCATC
VDriboR	ribosomal dans PA14	5000	55	,	GGACGGGTGAGTAATGCCTA
plas-295F	amplification du		55		AGCACGCAACTTGTGCATCT
plas-295R	promoteur de lasl pour gel shift assays (promoteur complet)	295	55	1	CAGAAAGTTTCCTGGCTTTCC
pqsLHindliiF	amplification du gène pqsL pour		55	Hindlft	CCCAAGCTTGGAACGACACGGAGACTCAT
pqsLEcoRIR	l'insérer dans pDN19	1619	55	EcoRI	GCTCTAGACAACTGGAAGTCAGCGTGAA
p+lasl-xbal-F2	amplification de		55	site Xbal	GCTCTAGATTTTGGGGCTGTGTTCTCTC
p+lasl-hindIII-R2	lasl avec son promoteur natif, en veillant à ne pas prendre <i>rsaL</i> .	960	55	site HindIII	CCCAAGCTTACTCGAAGTACTGCGGGAAA

Appendice C. Liste des amorces utilisées dans ce document.

Appendice D

Liste des vecteurs utilisés dans ce document

Appendice D. Liste des vecteurs utilisés dans ce document.

Nom	Description	Référence
	vecteur exprimant les gènes pqsA, pqsB et	Reference
pLG14	pqsC	(Gallagher et al., 2002)
pDN18mvfR	vecteur pDN18 exprimant mvfR	(Déziel et al., 2004)
plT2	vecteur contenant le transposon ISlacZ	(Jacobs et al., 2003)
pVD08	vecteur pDN19 exprimant pqsL	ce document
pLG12	vecteur exprimant les gènes pqsA, pqsB, pqsC et pqsD	(Gallagher et al., 2002)
pLG10	vecteur exprimant les gènes pqsA, pqsB, pqsC, pqsD et pqsE	(Gallagher et al., 2002)
pMW303	vecteur pEX1.8 contenant phzABC-lacZ Apr Cbr	(Whiteley et al., 2000)
pMW305	vecteur pHRP309 contenant <i>rhll-lacZ</i> , fusion transcriptionnelle, Gm	(Whiteley et al., 2000)
pECP60	rhlA-lacZ translational fusion, Cbr	(Pesci et al., 1997)
pME3826	pME6010 contenant les 780 pb en amont de hcnA en fusion traductionnelle avec lacZ fusion at the EcoRV site in hcnA	(Pessi & Haas, 2000)
pED1	mexG-lacZ transcriptional fusion, Cbr	(Déziel et al., 2005)
pGX5	vecteur pQF50 contenant la région -486 à +231 du promoteur de pqsA fusionné au gène lacZ, Cbr	(Xiao <i>et al.</i> , 2006b)
pGX6	vecteur pQF50 contenant la région -246 à +231 du promoteur de pqsA fusionné au gène lacZ, Cbr	(Xiao <i>et al.</i> , 2006b)
oGX1	vecteur pQF50 contenant la région -746 à +160 du promoteur de mvfR fusionné au gène lacZ, Cbr	(Xiao <i>et al.</i> , 2006b)
oGX2	vecteur pQF50 contenant la région -447 à +160 du promoteur de mvfR fusionné au gène lacZ, Cbr	(Xiao et al., 2006b)
DN19pqsE	vecteur pDN19 contenant pqsE inséré au moyen des enzymes HindIII et Xbal	Gaoping Xiao, labo L.G. Rahme
oUCPSK <i>rhlR</i>	pMIC62, rhIR inséré dans le vecteur pUCPSK contenant le promoteur lac au moyen des enzymes de restriction HindIII et EcoRI (5'-3' rhIR)	John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia
NTPS138	pNPTS129 derivative, oriT sacB Kanr	(Spratt et al., 1986)
JUCPSK <i>lasR</i>	pMIC61, <i>lasR</i> inséré dans le vecteur pUCPSK contenant le promoteur <i>lac</i> au moyen des enzymes de restriction HindIII et EcoRI (5'–3'	John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland,
MT1	lasR)	Australia
IVI (I	vecteur pUCP20 contenant plac-lasR	(Medina et al., 2003a)

		-11
pUCPSK <i>rhll</i>	vecteur pUCPSK contenant le promoteur <i>lac</i> , exprimant le gène <i>rhll</i> inséré au moyen des enzymes de restriction <i>Hin</i> dIII et <i>Eco</i> RI (5'–3' <i>rhll</i>)	John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia
pCDS101	Vecteur miniCTXlux amélioré pour diminuer la transcription basale du gène lux	(Sibley et al., 2008)
pGEM-t-easy	vecteur de clonage linéaire	Promega
pUCPSK	vecteur d'expression entre E. coli et P. aeruginosa	(Watson et al., 1996)
pDN19	vecteur d'expression	(Nunn et al., 1990)
mini-CTX- <i>lacZ</i>		(Becher & Schweizer, 2000)
pPCS1002	pLP170 containing rhlR-lacZ	(Pesci <i>et al.</i> , 1997)
pSB224.10A	pRIC380, vecteur suicide contenant rhIR::Tc	(Beatson et al., 2002b)
pVD1	pDN19 contenant le gène lasl avec son promoteur natif	(Dekimpe & Déziel, 2009).
pME3853	pME6010 contenant 174 pb en amont de <i>lasl</i> ainsi que ses 13 premières paires de bases, en fusion traductionnelle avec lacZ. Tc ^r	(Pessi et al., 2001)
pLJR50	rapporteur transcriptionnel lasBp-lacZ, contient la région -2190 à +4 nt de la région promotrice de <i>lasB</i> . Cbr	(Toder et al., 1994)
mini-CTX-lacZ	vecteur d'intégration pour insérer une copie unique de rapporteur transcriptionnel <i>lacZ</i> dans le site chromosomique <i>attB</i>	(Becher & Schweizer, 2000)

Appendice E

Articles publiés au cours de la thèse

Hazan, R., He, J., Xiao, G., <u>Dekimpe, V</u>., Apidianakis, Y., Lesic, B., Astrakas, C., Déziel, E., Lépine, F. & Rahme, L. G. (2010). Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence. *PLoS Pathog* 6, e1000810.

Contribution : J'y ai réalisé plusieurs expériences impliquant l'usage du spectromètre de masse (LC-MS). J'ai également contribué à l'analyse des résultats.

Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence

Ronen Hazan^{1,2}, Jianxin He^{1,2}, Gaoping Xiao^{1,2}, Valérie Dekimpe³, Yiorgos Apidianakis^{1,2}, Biliana Lesic^{1,2}, Christos Astrakas^{1,2}, Eric Déziel³, François Lépine³, Laurence G. Rahme^{1,2}*

1 Department of Surgery, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, United States of America, 2 Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, 3 INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Abstract

Pathogenic bacteria use interconnected multi-layered regulatory networks, such as quorum sensing (QS) networks to sense and respond to environmental cues and external and internal bacterial cell signals, and thereby adapt to and exploit target hosts. Despite the many advances that have been made in understanding QS regulation, little is known regarding how these inputs are integrated and processed in the context of multi-layered QS regulatory networks. Here we report the examination of the Pseudomonas aeruginosa QS 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) MvfR regulatory network and determination of its interaction with the QS acyl-homoserine-lactone (AHL) RhIR network. The aim of this work was to elucidate paradigmatically the complex relationships between multi-layered regulatory QS circuitries, their signaling molecules, and the environmental cues to which they respond. Our findings revealed positive and negative homeostatic regulatory loops that fine-tune the MvfR regulon via a multi-layered dependent homeostatic regulation of the cell-cell signaling molecules PQS and HHQ, and interplay between these molecules and iron. We discovered that the MvfR regulon component PqsE is a key mediator in orchestrating this homeostatic regulation, and in establishing a connection to the QS rhlR system in cooperation with RhlR. Our results show that P. aeruginosa modulates the intensity of its virulence response, at least in part, through this multi-layered interplay. Our findings underscore the importance of the homeostatic interplay that balances competition within and between QS systems via cell-cell signaling molecules and environmental cues in the control of virulence gene expression. Elucidation of the fine-tuning of this complex relationship offers novel insights into the regulation of these systems and may inform strategies designed to limit infections caused by P. aeruginosa and related human pathogens.

Citation: Hazan R, He J, Xiao G, Dekimpe V, Apidianakis Y, et al. (2010) Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence. PLoS Pathog 6(3): e1000810. doi:10.1371/journal.ppat.1000810

Editor: Marvin Whiteley, The University of Texas at Austin, United States of America

Received August 18, 2009; Accepted February S, 2010; Published March 12, 2010

Copyright: © 2010 Hazan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Funding: This work was supported by The Claflin Distinguished Scholar Award, Shriners Research grants #8770 and #8850 and National Institute of Health grant Al063433 to LGR. RH was supported by a Shriners Hospitals Research Fellowship (#8494). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rahme@molbio.mgh.harvard.edu

Introduction

Microbes translate environmental cues to coordinate and modulate gene expression such that they can adapt to different niches and overcome hostile environments. Adaptation and coordination of gene expression is particularly important for pathogenic microorganisms that need to colonize dynamic host environments since their ability to sense and respond to host environmental cues is critical for their survival. In bacteria, modulation and coordination of gene expression are also influenced by population density via the regulated production of small molecules that serve as intricate signals impacting the expression of virulence factor genes. Many studies have addressed the role of quorum sensing (QS) communication networks in virulence where by diffusible intercellular auto-inducers factor and environmental signals bacterial cultures mediate pathogenicity by coordinating the expression of a large array of genes [1,2]. Nevertheless, less is known regarding how environmental cues are translated in the context of QS signaling and how environmental cues and QS are integrated to promote the ability of a pathogen to survive and colonize particular niches within their host environments. The processing and integration of environmental inputs in QS becomes even more complex when a pathogen is able to occupy more than one niche.

Pseudomonas aerugmosa is a ubiquitous and an extremely versatile Gram-negative bacterium with an astounding ability to survive in many different environments and to infect multiple hosts ranging from amocbas to humans [3]. This pathogen has an extensively studied complex QS communication network that facilitates crosstalk between organisms and impacts many P. aeruginosa grouprelated behaviors including virulence [4, 5, 6, 7, 8, and 9]. There are at least three known QS systems in P. aeruginosa: two are dependent on the acyl-homoserine-lactone (AHL) OS transcription factors LasR and RhIR [10] and a third is dependent on the 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) LysR-type transcription factor MvfR [11,12]. MvfR activation is mediated by the cell-cell signaling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and 3,4dihydroxy-2-heptylquinoline (PQS), and leads to the positive regulation of many virulence-related factors, a large number of which are also controlled by the QS signal acyl-homoserinelactone (AHL)-mediated RhIR and LasR circuitry.

The MvfR pathway is a critical virulence component essential for the full virulence of P. aeruginosa in multiple hosts [13,14,15]

Author Summary

Bacterial cells can communicate with one another about their surrounding environment. This information can be in the form of small self-secreted molecules acting as signals to activate or inhibit the expression of genes. Pseudomonas aeruainosa is an environmental bacterium that infects diverse organisms from plants to humans. Our results show that this pathogen uses two highly sensitive networks, namely MvfR and LasR/RhlR pathways, to modulate its virulence functions by titrating the concentration of the small molecules HHQ and PQS in a manner that depends upon the presence or absence of iron. Via negative and positive feedback loops, this bacterium processes the signaled information to regulate its virulence functions and homeostatically balance the production of the small molecules required for the activation of the MvfR virulence network. Our study sheds light on paradigmatic complex networks that maintain a homeostatic bacterial virulence response.

and is connected to LasR and RhlR by: (i) the dependence of mvfR expression at the early growth stages as a result of positive control by LasR [16], (ii) the conversion of HHQ into PQS controlled by PqsH [17,18] whose expression is mediated by LasR [19,20], and (iii) the negative effects of RhlR on the pqs operon [16,21], which is responsible for the synthesis of all HAQs [11,14,19,22,23] including the MvfR ligands HHQ and PQS [12,17,21].

The QS regulons MvfR, LasR and RhlR respond not only to QS signal molecules but also to environmental signals [24], including host factors [25,26,27,28] and other environmental cues such as phosphate [29], magnesium [30] and iron [31,32,33,34,35]. Iron acquisition is controlled by a large set of P. aeruginosa genes activated in response to iron starvation [36,37,38], including two siderophore complexes, pyoverdine and pyochelin [39,40], and several ferric uptake regulators, among them are the general iron uptake regulator Fur, Furregulated pyoverdine siderophore-specific extracytoplasmic sigma factor PvdS, several ECF sigma factors, and the AraC regulator PchR, which regulates pyochelin uptake [40]. In low iron conditions, PvdS binds to iron-starvation (IS) boxes to induce the transcription of many genes involved in the iron starvation response [41]. The intricate relationship between QS and iron is exemplified by a series of findings demonstrating that iron starvation induced QS systems [26,32,34] and that the QS regulators MvfR [11], LasR/RhlR [42] and VqsR [31,43,44] were found to be responsible for the induction of many iron response genes. Moreover, MvfR contains an 1S box in its promoter [36], and PQS production is positively-affected by two Fur-regulated small RNAs, Prrf 1 and 2 [45]. Adding to the complexity of how environmental cues such as iron levels affect QS and how iron is integrated into QS to modulate virulence gene expression is the ability of PQS to bind iron [46], to act as an iron trap molecule [47], and to form a toxic complex against the host

MvfR activation by HHQ and PQS leads to the upregulation of the anthranilic acid (AA)- biosynthetic encoding genes phnAB, and pqsA-E operon [11,12,14] that have a conserved genomic organization in P. aeruginosa and in HAQs-producing Burkholderia species [49], to produce more HAQs leading to the upregulation of the MvfR-regulon in a positive feedback loop. Although the fifth gene of the pgs operon pgsE (PA14_51380), which encodes a predicted GloB, Zn-dependent hydrolase [50] and member of the metallo-beta-lactamase super family (Pfam PF00753), is not required for HAO synthesis [12,19], it is co-regulated together with the pqsA-D genes. We have shown that PqsE is essential for complete P. aeruginosa virulence in mice because it controls the expression of a number of MvfR regulon-dependent genes [11]. Although PqsE was previously implicated as the PQS response gene [19,20], it was recently shown to act independently of MvfR and PQS [51]. Thus, the PqsE functions associated with the integration and translation of the QS cell-cell signals has yet to be

Here we examine the interplay between environmental cues and cell-cell signaling molecules and assess how they are integrated in the modulation of MvfR regulon gene expression. To elucidate the QS multi-layered regulation, we also examine the functional dependency of the MvfR regulon components, especially PqsE, and PQS and HHQ, on the Rhl regulon. The findings presented offer new insights into the highly complex P. aeruginosa virulenceassociated regulatory loops that may aid in understanding and controlling its pathogenicity.

Results

Dissection of the QS MvfR regulon reveals a key component functioning independently of the cell-cell signaling molecules PQS and HHQ

To elucidate how multi-layered regulatory networks sense and respond to external and internal cell signals to modulate gene expression, we studied the role of MvfR pathway components in integrating and translating signals from PQS and HHQ in the activation of the MvfR regulon genes. To this end, we measured pyocyanin production as an index. This secreted P. aeruginosa phenazine was chosen since its production is dependent on the MvfR pathway components, including the cell-cell signaling molecules, PQS and HHQ and their corresponding biosynthetic enzymes PqsA-D, their AA precursor, PqsE, and on its Phz biosynthetic operons (Figure 1A and [11]). Here we found that overexpression of PqsE under a constitutive promoter (pDN19pqsE) in pqsA and mvfR mutant cells not producing HAQs restored pyocyanin production (Figure 1A). In contrast, overexpression of mufR under a constitutive promoter in a pasE background did not restore pyocyanin production (Figure 1A) even when HHQ, PQS, or PA14 cell-free supernatants were added (data not shown). These results highlight the crucial role of PqsE in the regulation of MvfR regulon-dependent factors and demonstrate that PqsE possesses activation properties that are independent of HAQ-mediated signals (Table S1). To assess PqsE mode of action on pyocyanin production, we co-cultured pqsE cells constitutively expressing the phenazine biosynthetic operon phzA2-G2 with pqsE cells harboring the phzM and phzS genes essential to pyocyanin synthesis [52] and assessed pyocyanin production. As shown in Figure 1B, approximately 60% of the pyocyanin production was restored, indicating that PqsE participated in pyocyanin production regulation rather than in its

Second, we tested whether the precursor of all HAQs, AA was required for PqsE function instead. To this end we used a triple mutant strain deficient in phnAB, trpE and kynBU (AA mutant) unable to produce any AA since all three AA synthesis pathways were knocked out [53]. Expression of PqsE in this triple mutant also resulted in high levels of pyocyanin production (Figure 1A) corroborating with the above results and demonstrating that PqsE function did not require AA or any of its derivatives to promote production of the MvfR regulon-dependent factor pyocyanin.

Third, since PasE controlled the regulation of one of the key MvfR-regulated factors, pyocyanin, we sought to define the impact

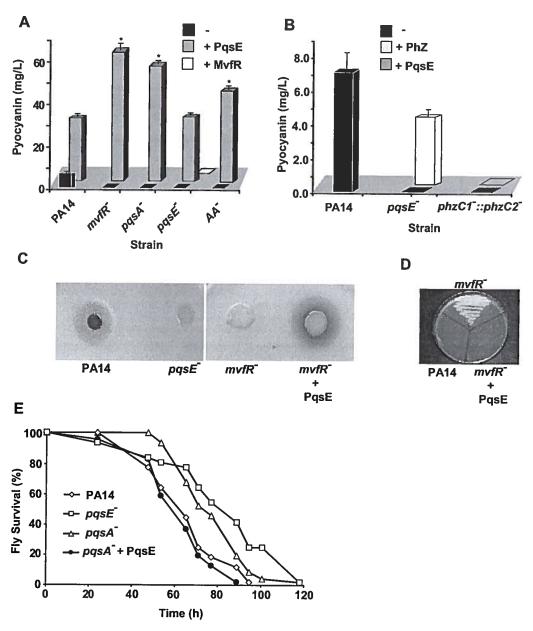


Figure 1. PqsE, a key mediator of the MvfR regulon activation, functions independently of AA and its derivatives. (A and B) Pyocyanin production was measured from PA14 and mutants with and without constitutive expression of PqsE or MvfR as a consequence of the presence of pDN19pqsE or pDN18mvfR plasmids, respectively. (A) AA is a triple mutant with non-functional phnAB, trpE and kynBU that does not produce anthranilate. Production of pyocyanin (+ Phz) was achieved by co-culturing two sets of cells one constitutively expressing phzA2-G2, and the other phzM and phzS genes encoding the phenazines and pyocyanin biosynthetic genes respectively. Asterisks in A show strains harboring the plasmid pDN19pqsE that are significantly different (P value < 0.01) from PA14 harboring that plasmid. (C–D) PqsE is essential for the virulence of P. aeruginosa against Cryptococcus neoformans independently of HAQs. PqsE was constitutively expressed in mvfR⁻ mutant cells. An empty vector served as a control (–). (C) 1 µL of bacterial culture was spotted onto YPD top-agar where yeast cells were plated. Yeast killing zones were formed only around the PA14 and mutant cells expressing PqsE. (D) The death of yeast cells within the killing zone was demonstrated by assessing their viability on YPD plates. (E) PqsE causes fly mortality in absence of HAQs. Survival kinetics of Drosophila melanogaster was assessed using a fly feeding assay. The survival kinetics of pqsA and pqsE infected flies was significant different (P value < 0.005) form that of PA14-infected flies. However, the kinetics of pqsA + PqsE- infected flies did not differ significantly from that of the PA14-infected flies(P value = 0.27). doi:10.1371/journal.ppat.1000810.g001

of this factor in the regulation of all MvfR-dependent virulence genes. We carried out whole genome expression studies and compared the expression profiles of a pgsE mutant to those of the PA14 parental strain, an myfR⁻ mutant and to those of PA14 and an mvfR over-expressing pqsE strain (NCB1 GEO, accession

number #GSE17147). These results showed that PqsE profoundly affected the expression of 90% of the MvfR-regulated genes, including at least thirty-six known and predicted transcription factors (Tables S1B and S2). Of the PqsE-dependent genes, 241 were found to be negatively regulated and 384 positively regulated

by PqsE (Table S1). At least 75 positively-regulated genes encoded for putative or known virulence factors (Table S1) [11,42]. Importantly, included among the positively-regulated virulence transcriptional factors was the QS AHL regulator *rhlR* [38] and iron response genes, including the iron starvation sigma factor *pvdS* and genes involved in the synthesis of the siderophore complex pyochelin (Table S3A).

To confirm that PqsE overexpression also restores virulence functions apart from restoring their expression independently of the signaling molecules PQS and HHQ, we used two assays. The first is based on the observation that virulent P. aeruginosa strains; including PA14 kill yeast [54,55,56]; and the second is based on that P. aeruginosa can infect and kill Drosophila melanogaster [57,58,59], and that myR mutant cells exhibit attenuated virulence in flies [57]. As illustrated in Figure 1C-D, a zone of yeast growth inhibition was observed around PA14, but not around the $mvfR^-$, or pqsE mutants following plating of C. neoformans KN99a 5 mm from the bacterial colony on a YPD plate (Figure 1D). The killing zone was restored following PqsE overexpression in mvfR backgrounds (Figure 1C-D). In agreement flies infected with pgsA or pgsE mutants cells exhibited significant delayed in mortality compared to that caused by the WT or the pgsA cells expressing pqsE (Figure 1E) demonstrating again that PqsE is crucial for P. aeruginosa pathogenicity and independent of PQS and HHQ.

MvfR-dependent gene regulation relies on the functional cooperation between RhIR and PqsE

Comparison of the pqsE transcriptome (Table S1) to lasR/rhlR [42] revealed that almost half (46%) of the genes regulated by LasR/RhlR were also regulated by PqsE (Figure S3A) indicating a

relationship between AHL- and MvfR-mediated QS regulons. This relationship is also extended to the negative effects that both components have on the transcription of the pqs operon ([16] and Table S1 and Figure 2A). A green fluorescent protein (GFP) reporter gene [32] fused to the pqs operon promoter (Figures 2B), quantitative PCR analysis (Figure S2D) and quantification of HHQ and PQS levels (Figure 2C) further validated the above finding. Moreover, in agreement, Figure 2D shows that HAQ synthesis down-regulation paralleled the accumulation of AA (HAQ precursor) followed by an increase in antABC gene expression that encodes enzymes for AA degradation (Table S1).

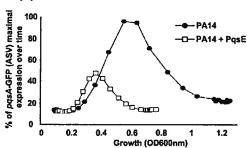
To determine whether there was indeed a functional relationship between the respective communication-systems components RhlR and PqsE in the regulation of the MvfR regulon signal production and whether they together affected signal integration, we proceeded to assess whether there was a RhlR-PqsE codependency in the negative regulation of HAQ biosynthesis. Figures 3A and S4B show that overexpression of PqsE in a rhlR-mutant did not result in a downregulation of the promoter-derived expression of the pqs operon in contrast to the overexpression of PqsE in the wild-type (WT) strain PA14 where expression of the pqs operon was downregulated (Figure 2 and Figure S2D). These results indicate that PqsE negative control of the activity of the MvfR regulon depends on RhlR.

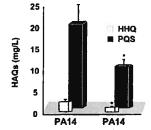
Second, we examined whether there was an RhlR-PqsE codependency in signal integration by MvfR-regulon virulence genes downstream of PqsE. To this end, we assessed whether PqsE overproduction in *thlR*⁻ cells could restore pyocyanin production since it was completely abolished in both *pqsE*⁻ [11,19] and *thlR*⁻ [38] mutants. Figure 3B shows that PqsE did not restore pyocyanin production in *thlR*⁻ while RhlR expression partially (~30%)

A Transcription (transcriptome)

(PAO1)	PA14 orthologs	Gene name	pqsE*	PA14 + PqsE
PA0996	PA14_51430	pqsA	2.48	-4.59
PA0997	PA14_51420	pqsB		-13.28
PA0998	PA14_51410	pasC		-9.35
PA0999	PA14_51390	pqsD	2.11	-10.93
PA1000	PA14_51380	pasE	-12.58	
PA1001	PA14_51360	phnA	2.67	-8.85
PA1002	PA14_51350	phnB	2.41	-8.55

B pqsA-GFP





PqsE

C HAQs production

D AA production

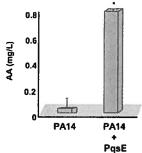


Figure 2. The homeostatic regulation of the signaling molecules HHQ and PQS is orchestrated by PqsE. Effect of PqsE on pqs operon gene expression, and production of HAQs and AA. (A) Fold change in expression of phn and pqs operons in pqsE⁻ mutant and PA14 constitutively expressing PqsE versus PA14. (B) GFP intensity derived from a pqsA-GFP(ASV) reporter fusion; (C) HAQs and (D) AA levels as assessed by LC-MS. t-tests (p = 0.001 for HHQ and p = 0.004 for PQS) showed that the difference between PA14 and PA14+PqsE is statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1000810.g002

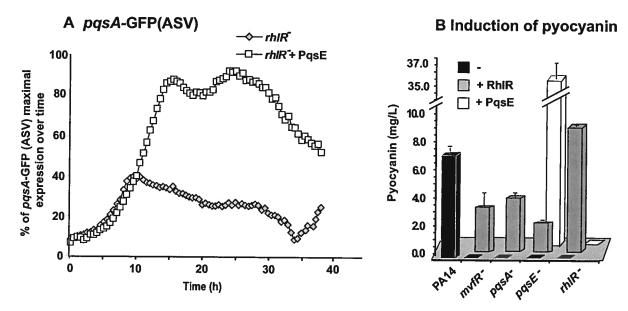


Figure 3. MvfR network regulation requires finely tuned cooperation between the MvfR component PqsE and the AHL QS regulator RhIR. (A) The expression of pqsA was determined by measuring GFP emission. A pqsA-GFP (ASV) fusion in the rhIR mutant harboring pDN19pqsE was used to determine pqsA expression levels. (B) Pyocyanin levels were measured from various PA14 mutants harboring either pDN19pqsE or pUCP20rhIR plasmids. Empty vector served as control. doi:10.1371/journal.ppat.1000810.q003

restored pyocyanin production in $pqsE^-$ mutant cells. This finding suggests that PqsE also depends on RhlR in the positive regulation of pyocyanin production and that RhlR acts downstream of PqsE. Interestingly, Figure S5 shows that pyoverdine levels are higher in hlR^- than in PA14 but not in $pqsE^-$ mutant cells. Moreover, PqsE or RhlR overproduction in hlR^- or $pqsE^-$ mutant cells respectively did not fully downregulated pyoverdine production, while PqsE or RhlR overproduction in the corresponding mutant cells did (Figure S5). This finding suggests RhlR-PqsE codependency in the homeostatic regulation of pyoverdine.

Based on the above findings, it is likely that the PqsE-RhlR activities were not limited to controlling downstream genes associated only with pyocyanin or pyoverdine production if the high number of genes co-regulated by PqsE and the Las/Rhl system are considered (Figure S3A).

Signal integration studies reveal a homeostatic negative feedback regulation by HHQ and PQS on cell-cell signaling and PqsE-controlled genes, respectively

The pyocyanin levels produced by the non-HAQs producing mutants pqsA, mvfR and AA [12,19,22,53] overexpressing pqsE were higher than the levels produced by the HAQs-producing PA14 parental strain carrying the same plasmid (Figure 1A). This difference raised the question regarding whether the presence and/or levels of HAQs had dose-dependent negative effects on pyocyanin levels. To this end we assessed the effect of exogenouslyadded HAQs on pyocyanin levels by using 20 mg/L of POS or HHQ, a concentration corresponding to the approximate maximal physiologic levels reached by PA14 or pqsH strains respectively at stationary phase ([17] and Figure S4A). Figure 4A shows that the pyocyanin levels in either pqsA::pqsH or mvfR mutants overexpressing pqsE were significantly lower in the presence of either HHQ or PQS. Figure 4B shows that PQS concentrations (up to 1 mg/L) induced pyocyanin production in both pqsH and pqsA ::pqsH cells but concentrations >1 mg/L decreased pyocyanin production in a dose-dependent manner in

all strains tested (Figure 4B) without significantly affecting cell growth (data not shown). This concentration-dependent decrease in pyocyanin levels was independent of PqsE function and phz operon regulation since it was also observed in pqsE cells constitutively expressing phz genes (Figure 4C). The PQS-mediated down-regulation was not specific to PA14 cells as it was also observed in the PA01 P. aeruginosa strain (Figure 4C).

To determine whether high physiological levels of PQS and/or HHQ negatively-impact pqs operon gene expression, we conducted experiments using pqsA=::pqsH= cells harboring the pqsA-GFP (ASV) reporter gene. Figure 4D shows that 20 mg/L HHQ negatively-impacted pqsA gene expression compared to 10 mg/L. PqsA gene expression was not affected by any of the PQS concentrations tested. Interestingly, a negative effect on pqsA gene expression, similar to that observed following treatment with 20 mg/L HHQ, was also observed when the two HAQs were added together in sub-inhibitory concentrations (1 mg/L PQS +10 mg/L of HHQ). This result is indicating that together HHQ and PQS have synergistic inhibitory effect and implying also that high activation of the pqs operon led to its down-regulation.

To further elucidate the role of PQS on PqsE-dependent gene regulation, we compared the transcriptional profiles of mvfR mutant cells overexpressing PasE in the absence or presence of 20 mg/L PQS (Table S1). High PQS concentrations negatively affected the expression of 191 of 625 (31%) PqsE-regulated genes (Figure 4E and Table S1). This effect was more apparent among the known and putative virulence factors where the expression of 64% of the PasEregulated genes, (including chitinase, halovibrin, cellulase, pyocins, lectin, and clastase genes) was significantly reduced by more than 2fold upon PQS addition (Table S1). The addition of PQS further increased the expression of only 7 genes: fpul, the major pyoverdine receptor; gatC, a Glu-tRNA amidotransferase subunit C; sucA, a 2oxoglutarate dehydrogenase; bkdA1, a 2-oxoisovalerate dehydrogenase and of three hypothetical proteins; PA4642, PA1343 and PA2405 (Table S1). Interestingly, transcription of phz operon genes was not modified by the addition of PQS although pyocyanin

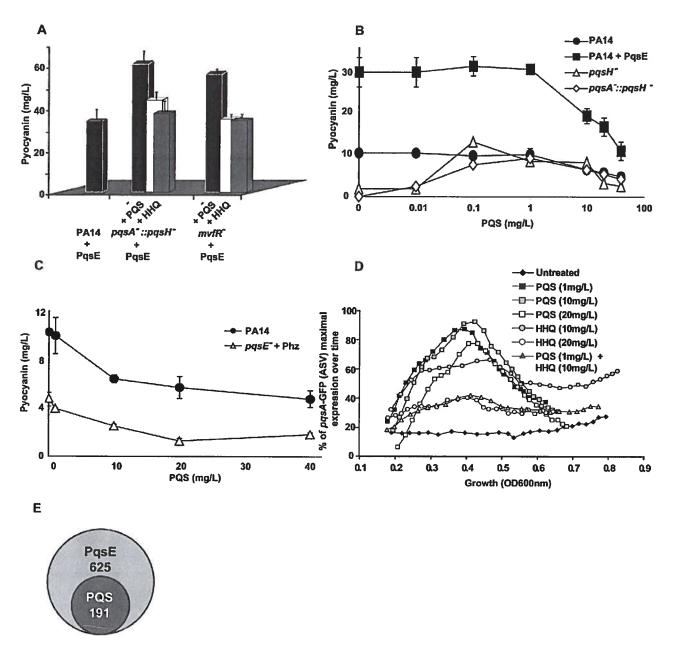


Figure 4. Negative homeostatic feedback regulation on MvfR regulon products and activity is mediated via cell-cell signaling molecule concentration. (A) Pyocyanin levels were assessed in PA14 and mutants cells harboring the plasmid pDN19pqsE with or without the addition of PQS or HHQ (20 mg/L). t-tests (p<0.05) showed that the difference between untreated and PQS/HHQ treated cells was statistically significant (B–C) Pyocyanin levels were determined following the addition of PQS over a broad-range of concentrations using a PQS non-producing strain (B) or using a narrow range of PQS concentrations in PQS-producing strains (C). PqsE was constitutively expressed (+PqsE). The empty vector was used as a control. phz genes were expressed following co-culture of pqsE⁻ cells constitutively expressing the phzA2-G2 with pqsE⁻ cells constitutively expressing the phzA2 and phzS genes. The cells were grown in the presence of exogenously added PQS and pyocyanin production measured by measuring the OD_{600 nm}. (D) The expression of pqsA was determined using a pqsA-GFP (ASV) fusion in a pqsA-::pqsH⁻ double mutant in the presence of various concentrations of HHQ and PQS. (E) A Venn diagram showing the number of PqsE-regulated genes counterbalanced by PQS. The data was adapted from Table S1. doi:10.1371/journal.ppat.1000810.g004

production was affected (Figure 4A), suggesting that PQS may be acting post-transcriptionally in this case.

Homeostatic feedback modulation of the MvfR regulon is fine-tuned by an iron starvation response

As shown in Table S3A, PqsE positively-affected the expression of 43 iron starvation-related genes [36,37] including the iron

starvation sigma factor PvdS [41,60], the pyochelin regulator PchR [61], vqsR [31,62] and PA2384 [63]. Interestingly, PqsE negatively regulated only 6 iron related genes, bfrB and the siderophore pyoverdine associated genes pvdA pvdF, pvdJ, pvdN and pvdQ (Table S3A) reflected also in the pyoverdine levels (Figure S5). It is noteworthy that PqsE acted differentially on the siderophores, serving as a positive regulator of pyochelin and a negative regulator of pyoverdine (Figure S5). In addition, Table

S3A reveal that HAQs are also involved in the control of ironrelated genes by PqsE since constitutive expression of pqsE triggered this effect in the mvfR⁻ background cells lacking HAQs but not in PA14 cells.

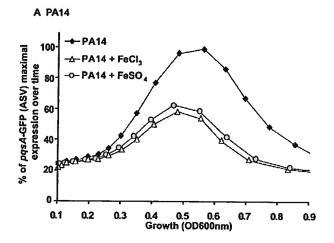
To examine how iron starvation is translated in the context of MvfR signaling, we first examined whether there is a relationship between iron starvation and the regulation of PQS and MvfR regulon genes. We compared pqsA transcription using a pqsA-GFP (ASV) reporter in PA14 cells grown in the absence (D-TSB medium) or presence of high iron levels. Figure 5A demonstrates that iron significantly reduced pqsA transcription. Subsequently, we examined the effect of iron directly on the induction of pqs operon transcription in presence only of PQS and not of other HAQs in pqsA-::pqsH- mutant cells. Using 1 mg/L PQS, an amount sufficient to fully induce pqs operon transcription and increasing concentrations of FeCl₃ Figure 5B shows an iron concentration-dependent effect on pqsA gene expression.

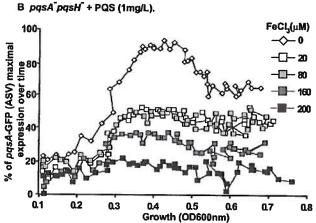
We next examined if iron could also counterbalance the downstream effects of PQS on PqsE-dependent genes by assessing the effect of HAQs and iron on pyocyanin production. Figure 5C shows that the addition of iron abolished the reduction in

pyocyanin production conferred by PQS (20 mg/L) and restored pyocyanin production to that observed in the presence of 1 mg/L PQS. A similar effect was observed in PA14 cells and pqsA⁻⁻⁻pqsH cells overexpressing PqsE (Figure S6A) where the addition of 20 mg/L PQS decreased pyocyanin levels which were restored in the presence of iron. Since iron alone did not affect pyocyanin production in the experimental conditions used, it suggested that pyocyanin production was affected due to direct effect of iron on PQS. No significant difference in growth was observed between PA14 cells grown in absence or presence of various concentrations of iron (up to 250 μM, Figure S6B). Collectively, these findings indicate that iron counterbalanced PQS-dependent regulation by 'fine-tuning' its activity, possibly by reducing PQS activity when it is in a complex with it.

Discussion

In this work, we delineated paradigmatically the complex relationships between bacterial multi-layered regulatory QS circuitries, their signaling molecules, and the environmental cues to which they respond.





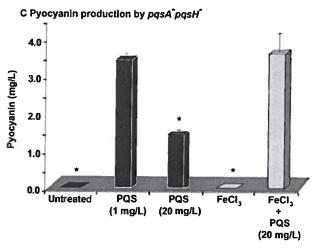


Figure 5. Homeostatic interplay between PQS and iron: Iron fine-tunes PQS activities. The effect of iron on MvfR induction was tested using the pqsA-GFP reporter in PA14 (A) and PA14 pqsA-::pqsH cells treated with PQS (1 mg/L) (B). The effect of iron on pyocyanin production was tested when PQS was supplied at 1 mg/L or 20 mg/L (C). The cells were grown in low iron medium D-TSB or in media supplemented with iron (FeCl₃ or FeSO₄, 200 μM). Asterisks show samples that are statistically significant different (P value<0.05) from the PQS 1 mg/L treated sample. doi:10.1371/journal.ppat.1000810.g005

The intracellular communication system of *P. aeruginosa* possesses complex signal transduction systems allowing this versatile pathogen to regulate and coordinate virulence functions in the context of multiple hosts, environments, and competition from other microorganisms [7,64,65,66]. Here we showed that one of these complex signal transduction systems, MvfR, responds to both positive and negative feedback loops that are interconnected with the RhlR QS complex system and that these interactions fine tune the production and concentration of secreted output signals that in turn serve as inputs to preserve a homeostatic regulation. Moreover, our experiments demonstrated that via the finely tuned cooperation and homeostatic interplay between the MvfR circuitry components PqsE, and PQS and HHQ with RhlR and iron, this pathogen governs and balances the intensity of its virulence response.

Although HHQ and PQS principally serve as MvfR ligands [17,18], our results show that once maximal in vitro physiological levels are reached, they negatively impact their own production and the downstream PqsE regulated genes. PqsE, HHQ and PQS are essential molecules in the negative feedback auto-regulatory loops that contribute to this homeostatic regulation. Although the HHO concentrations shown here are not attained in vitro because HHQ is fully converted into PQS, this effect is most likely relevant in vivo where we have shown that HHQ levels are higher than those of PQS [17]. In addition, in lasR mutants that accumulated during chronic infections HHQ levels are also higher than PQS since PqsH responsible for the conversion of HHQ to PQS is under the control of LasR [67]. Nevertheless, we show that HHQ and PQS have together synergistic effect as a negative autoregulators that down-regulated pqs operon transcription, reducing their own production and that of the other HAQs. Thus, jointly with PqsE, PQS and HHQ most probably contributed to the down-regulation of the pqs and plin operons observed during the late growth phase of *P. aeruginosa* (Figure S1).

In addition to being activator and auto-down-regulator PQS acted also as a homeostatic agent at high physiological concentrations by down-regulating most PqsE-dependent, downstream genes. Consistently, maximum pyocyanin production occurred only at low PQS concentrations that were sufficient to maximally activate the pqs operon. The homeostatic effect of PQS downstream of the PqsE genes was clearly independent of MvfR, PqsE and of other HAQs given that its effects were still apparent in pqsA and mvfR backgrounds. Interestingly, this effect appeared also to be post-transcriptional since PQS did not significantly impact phz operon transcription but affected pyocyanin production even when the phz operon was constitutively expressed. The mechanism behind this effect remains to be discovered. One intriguing possibility may be that PQS exerts its effect via RsmA and/or on small RNAs like rsmZ or pnF.

Previous studies have suggested that while PqsE is the PQS response protein [19,20], it does not influence PQS production [11,12]. Here we show that PqsE is a crucial player in orchestrating the homeostatic regulation of the signaling molecules HHQ and PQS as well as establishing a connection to the QS RhlR system, underscoring it as a key mediator of MvfR regulon activation and cooperation with the AHL QS system. Our findings also provide initial answers as to why PqsE, although not involved in the synthesis of HAQs in vivo or in vitro [11,19,20]), is tightly regulated together with the other pqs operon genes. Although our findings are primarily based on trans-regulatory studies, the overexpression of PqsE demonstrated for the first time that PqsE can impact HAQs concentrations by down-regulating their production. In corroboration, are both the AA accumulation and the transcriptional induction of the antABC genes responsible

for AA degradation [68,69] and shown to be regulated by prrF1 and prrF2 [45]. Since pqsE is co-transcribed by MvfR together with pqsA-D genes, the reduced production of HAQs mediated by PqsE indicates that pqsE gene transcription itself is also downregulated in a negative feedback mechanism that finely balances the regulatory loop.

Although PQS and HHQ signal molecules are critical to MvfRdependent gene expression, their addition has failed to rescue pgsE mutant cells to activate expression of many MvfR-regulated genes or to produce of pyocyanin [11,17,19,20]. Here we found that overexpression of PqsE induced pyocyanin production and transcription of an additional approximately 600 MvfR-regulated genes independently of MvfR, HAQs and AA, demonstrating the crucial role of PqsE in activating MvfR regulon genes independently of the HAQs. Ultimately, expression of PqsE in an mufR or pqsA strain restored P. aeruginosa virulence as determined by growth inhibition of yeast and flies feeding assay, indicating that PqsE did not need HAQs to confer virulence in these systems. Corroboratory results were reported by Farrow et al. [51] who showed in a qualitative manner that expression of PqsE in an mvfR⁻ mutant restored pyocyanin production. These results together indicate that, at least with regard to the genes listed in Table S1, PQS and HHQ only act as inducers of MvfR to express PqsE that once expressed induces the P. aeruginosa virulence response without HAQs or MvfR. Thus, PqsE cannot be designated as the "quinolone signal response protein". Nevertheless, it is not yet known how PqsE, a protein that belongs to the metallo-beta-lactamase super family without any known DNA binding motifs, regulates the transcription of so many genes. Its predicted hydrolase activity suggests that it may cleave or participate in the synthesis of small molecules. Due to the location of the pasE gene in the pas operon, the immediate candidates likely targeted by PqsE are HAQs. However following extensive LC/MS analyses, we were unable to detect any molecule that accumulated or diminished in concentration in pqsE cultures compared to WT cultures (data not shown). In addition we were unable to complement pyocyanin production in a pqsE culture by exogenously adding HAQs, AHLs or whole PA14 supernatants ([11] and data not shown). Nonetheless, collectively, our results indicate that PqsE is involved in a negative feedback loop that affects the regulation and integration of HAQs-mediated cell-cell signaling molecules and that is functionally dependent on RhlR. The exact nature of the co-dependency between PqsE and RhlR remains unclear. The downregulation of rhlR expression by ~2 fold in a pasE mutant is not sufficient to explain the striking transcriptional and phenotypic effects mediated by PqsE. Since PqsE is not predicted to be a transcriptional factor [50] it is highly likely that it may exert its effect on RhlR post-transcriptionally, and this effect may be perhaps extended to other transcriptional factors.

The MvfR affected gene list has a substantial overlap [11] with the previously published list of Rhl/Las-controlled genes [42], and the expression of almost all MvfR-regulated genes controlled by PqsE. Both PqsE activities (i.e., fine-tuning HAQs production by down-regulating the pqs operon, induction of pyocyanin production and downregulation of pyoverdine production) were dependent on RhlR apparently acting downstream but in a tight collaboration with PqsE. Recently, Farrow and colleagues showed that the addition of AHL C₄-HSL (a RhlR inducer) to PAO1 pqsE isogenic mutants also restored pyocyanin production [51]. These findings, although we did not reproduce them in PA14 cells, are in agreement with our findings that PqsE and RhlR functions are linked. However, the exact relationship between PqsE and RhlR, that is when or how they cooperate, remains clusive since

RhlR in some cases functions in the absence of PqsE; for example, the RhlR-dependent C4-HSL levels in a pqsE mutant strain were identical to the parental strain (data not shown) as also was previously shown for the mvfR mutant [11].

The relationship between iron, QS regulation, and P. aeruginosa virulence is multifaceted [31,32,34,36,45,63] and extremely complex. Data presented in this report demonstrate that the MvfR regulon represents a striking paradigm of the interplay between environmental signals and bacterial secreted cell-cell signal molecules that participate in positive and negative homeostatic regulatory loops. QS MvfR components control the transcription of many iron related genes, while iron related regulators control the expression of QS genes (see Table S3B) in addition to iron related genes. The relationship between iron and QS regulation is further strengthened through the iron-related regulators VqsR [43] and the PA2384 product [63] that were found to control the expression of phnAB and pqsA-E operons. Furthermore, the iron starvation sigma factor PvdS was shown to positively control the expression of mufR via its IS box [36], iron was shown to control the pqs operon during biofilm formation [32], and the two small Fur-regulated RNAs Prrf 1 and 2 positively-regulated PQS production [45]. Our results showing that iron levels affected HAQs activities both as inducers of MvfR and as fine-balancers provide corroboration for the view that the MvfR regulon is closely linked with iron regulation. The complexity of the interplay between the MvfR regulon and iron control is further increased by: a. the ability of PQS but not HHQ to trap iron [47], which likely reduces available iron within the cell and promotes iron starvation, thereby affecting PqsE-mediated control of bacterial iron response genes, including the siderophores pyochelin and pyoverdine; and b. iron, especially in high concentrations, induces oxidative stress that was shown to affect and being affected by PQS [70]. Thus, it is possible that some of the phenotypic effects of PQS and iron shown here could be attributed to oxidative stress. Thus, it would be of importance to further investigate the contribution of iron, as a nutrient, a signal molecule, and an oxidative stress inducer in QS and P. aeruginosa

The existence of a tight interconnection between iron concentrations, QS, and virulence in P. aeruginosa is likely due to iron conditions encountered in vivo [71,72] serving as a signal indicating a hostile environment requiring expression of virulence or fitness-related genes. When host tissues become damaged as a consequence of virulence factor production, the resulting increase in iron concentrations should down-regulate virulence factor concentrations, thereby reducing bacterial virulence that may favor host survival and potentially chronic infection.

A complete understanding of the regulation of the multiple P. aeruginosa virulence networks, in particular the mechanisms of the homeostatic and down-regulation processes (Figure 6), will be essential for the development of drugs targeting QS inhibition [73,74]. The findings presented in this study may aid in the design of anti-infective therapies tailored to interfere with virulence pathways and provide a paradigm for understanding the complex QS networks of other bacterial pathogens besides that of P. aeruginosa.

Materials and Methods

Bacterial strains, growth conditions, and plasmids

Table S4 lists bacterial strains and plasmids used in this study. P. aeniginosa were routinely grown in Luria Bertani (LB) broth at 37°C for 18 h, and diluted to $OD_{600\ nm}$ 0.05 and grown to the desired OD_{600 nm}. For low iron media the bacteria were grown in D-TSB

medium [36] that was treated with Chelex 100 beads (Bio-Rad. Hercules, CA) and for high iron FeCl₃ or FeSO₄ were added at concentrations of 200 µM. The E. coli JM109 strain was used for sub-cloning and plasmid propagation. The E. coli S17-1 strain was used for conjugation between E. coli and P. aeruginosa by the pEX18Ap-derivative allelic replacement method [75]. Antibiotics used included ampicillin (Amp) (100 µg/ml), carbenicillin (Crb) (300 µg/ml), gentamycin (Gnt) (15/60 µg/ml), kanamycin ((Kan), 50/200), tetracycline (Γet) (15/200 μg/ml) and chloramphenicol (Cam) (15/50 µg/ml) for E. coli and P. aeruginosa respectively.

DNA manipulations

The plasmid overexpressing PqsE was generated by PCR amplification of the pqsE gene from PA14 genomic DNA using primer pairs GX119 and GX120 (Table S4). The PCR product was digested with HindIII/XbaI and sub-cloned into the pDN19 plasmid vector under plac promoter to generate pDN19pqsE that constitutively expresses pqsE. Construct integrity was confirmed by DNA sequencing. Plasmids were introduced into E. coli or P. aeruginosa PA14 by electroporation. Non polar deletions were generated by pEX18AP allelic replacement using sucrose selection. Fragments with the size of about 1 kb flanking the desired genes were cloned into the pEX18Ap plasmid vector and introduced into E. coli by electroporation followed by conjugation to P. aeruginosa. Alternatively, the λ-Red recombinase method was used to generate chromosomal deletions or insertions [53].

Reporter genes

Two kinds of reporter genes were used: 1) translational and transcriptional fusions to lacZ where the β-galactosidase activity assay was performed in triplicate as described [76] and; 2) a pqsA-GFP (ASV) fusion consisting of a pqsA promoter upstream to a short-lived GFP that allows for the detection of pas operon up or down regulation carried on the plasmid pAC37 [32]. Overnight cultures were diluted to an $OD_{600\ nm}$ of 0.05 in black, clear bottom sterile 96-well assay plates (Corning Inc., Corning, NY). The plates were incubated for 50 h at 37°C in an Infinite F200 plate reader (Fecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). Every 30 min the plates were shaken for 2 min and read at 600 nm and fluorescence detected by excitation at 485 nm and emission at 535 nm. The results are expressed as an average of 3-6 observations that were normalized to a strain that did not carry the plasmid pAC37.

RNA isolation, generation and analysis of transcriptome data

Bacteria were respectively grown overnight at 37°C, diluted to an OD_{600 nm} of 0.05 in 25 ml LB with the corresponding antibiotics at 37°C until the OD600 nm reached 3.0. The total RNA was isolated with the RNcasy Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) and cDNA synthesis and labeling performed according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). The P. aeruginosa PAO1 GeneChip® Genome array (Affymetrix) was used for hybridization, staining, washing and scanning according to the manufacturer's instructions. Experiments were independently performed in triplicate. Affymetrix DAT files were processed using the Affymetrix Gene Chip Operating System (GCOS) to create .cel files. The raw intensity .cel files were normalized by robust multi-chip analysis (RMA) (Bioconductor release 1.7) with PM-only models. Array quality control metrics generated by the Affymetrix Microarray Suite 5.0 were used to assess hybridization quality. Normalized expression values were analyzed with SAM (Significance Analysis of Microarray) using the permuted unpaired two-class test. Genes

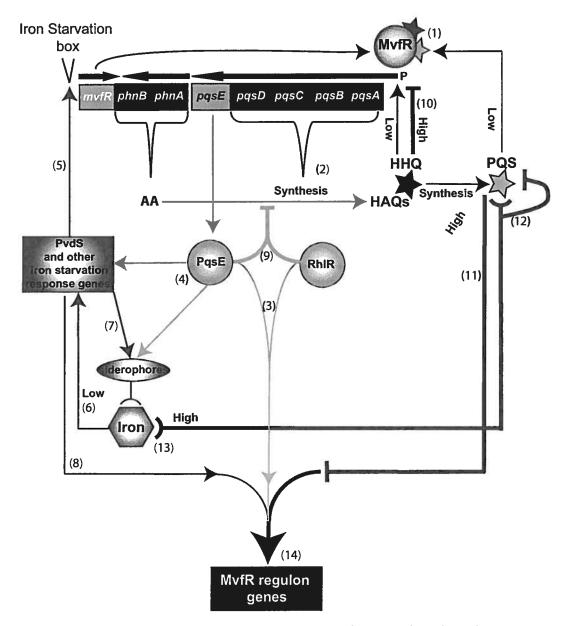


Figure 6. Schematic of the positive and negative homeostatic interplay among the MvfR regulon components PqsE, and PQS and HHQ with RhIR and iron. PasE (green), HHQ and PQS (blue) and iron (red) play a dual role in up- or down-regulating the MvfR regulon. The outcome—that is the level of downstream gene expression translated into the bacterial virulence response—is the integrated sum of these interactions. Positive loops (thin lines): (1) MvfR is induced by HHQ and its derivative PQS to express phn and pas operons, which are in turn (2) responsible for the synthesis of HAQs. PqsE is not required for HAQ synthesis and does not need AA or its derivatives for its "bottleneck" function, (3) controlling the expression of many virulence factors in cooperation with the AHL regulator RhIR. (4) PqsE also controls many iron starvation response genes, such as PvdS and siderophores. (S) PvdS in turn up-regulates the transcription of mvfR via an iron starvation box. (6) Low iron conditions also contribute to the induction of PvdS and other iron-related regulators to activate the iron response including (7) uptake of iron into the cell by siderophores as well as (8) induction of the virulence response. Negative loops (thick lines): (9) PqsE in cooperation with RhIR down-regulates the expression of the phn and pqs operons, thus reducing HAQ production. When a threshold concentration of HHQ is reached, (10) HHQ down-regulates the pas operon. (11) PQS at high physiological levels in turn counterbalances the expression of PqsE-controlled genes, including many virulence factors. High levels of iron in presence of low levels of PQS, reduce P. aeruginosa virulence, at least in part, by (12) binding and inactivating PQS. In contrast, when PQS is at high physiological levels its inactivation by iron will increase virulence by reducing the negative PQS counterbalance and thus sustain the positive loops that include (13) iron starvation as a result of PQS trapping iron. (14) The integration of these processes enforces a finetuning of MvfR regulon gene expression levels, therefore determining the magnitude of virulence. doi:10.1371/journal.ppat.1000810.g006

whose transcript levels exhibited either a 2-fold or up or down regulation and had a q value <6% were further analyzed. The results of the GeneChip® arrays were imported to GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) and the expression

signals of the GeneChip® arrays were normalized to the constant value of 1.0 and the ratio cut-off was set to 2-fold. Annotations were performed using the database http://pseudomonas.com/. The transcriptome results were (in part) validated by assessing β -

galactosidase expression and RT-PCR of selected genes (Figure S2). The data are deposited in NCBI GEO with accession number #GSE17147.

Quantitative real-time RT- PCR

Cells from each triplicate experiment were harvested at an OD_{600 nm} of 2, 3 and 4. Total RNA was subsequently isolated using the RiboPure-Bacteria RNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized with random reverse primers using the Reverse Transcription RETROscript kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. Specific primers (Table S4) for the amplification of products of approximately 200 base pairs were designed using the Primer3 algorithm (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) and analyzed by In Silico simulation of PCR amplifications (http://insilico. ehu.es/) and by the Primer Analysis Software NetPrimer (Premier Biosoft International, http://www.premierbiosoft.com/netprimer/ index.html) for the detection of expressed pqsA, pqsE and rpoD that served as the normalizer genes [77]. Quantitative RT-PCR was carried out using the Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) with a RT Fluorescence Detection System MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA) in a 25 µl final volume. The efficiency of each pair of primers was determined by a standard curve of 8 dilutions of 1:4 of PA14 genomic DNA. The relative expression ratios were calculated and analyzed using MXPro analysis software, version 4.01 (Stratagene) using a mathematical model that included an efficiency correction. The fold induction of mRNA was determined from the threshold values that were first normalized for rpoD gene expression that served as a normalizer and then for the threshold value of the WT strain harboring the pDN19 plasmid at an $OD_{600 \; nm}$ of 2 that served as the calibrator. The data are expressed as the average of triplicate samples.

HAQs detection

The quantification of HAQs concentration in bacterial culture supernatants and in vivo from rectus adominus muscle of burned and infected mice was performed by LC/MS as described previously [17,78]. The HAQs were separated on a C18 reverse-phase column connected to a mass spectrometer using a water/acetonitrile gradient [78]. Positive electrospray in the MRM mode with 2×10⁻³ mTorr argon and 30 V as the collision gas were employed to quantify HAQs using the ion transitions HHQ 244>159, HHQ-D4 248>163, HQNO 260>159, PQS 260>175, and PQS-D4 264>179. The pseudomolecular ions of each compound were monitored in full scan mode using the unsaturated PA14 HAQs response factors.

Pyocyanin production assay

Samples of 5 ml were spun down and the supernatants mixed with equal volumes of chloroform. The lower blue organic phase was collected and mixed with 5 ml of HCl (0.2 N). The upper reddish phase was collected and its $\mathrm{OD}_{52~\mathrm{onm}}$ was measured. The concentration of pyocyanin was determined by the formula: mg/L = $OD_{52 \text{ onm}} \times 17.072$ normalized to cell counts and the statistical significance was assessed using the Student's 2 tailed t-test assuming equal variance [79]. In order to assess the production of pyocyanin by expression of the phz genes we used a co-culture of cells harboring the pUCP-A2G2 and pUCP-MS plasmids [80]. All experiments were performed in triplicate.

Pyoverdine production detection

D-TSB medium was used to grow 200 µl of bacterial cells in 96 wells plate. Production of pyoverdine was assessed using a plate

reader (Infinite F200, Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). Pyoverdine levels were determined every 30 minutes using excitation at 400 nm and emission at 460 nm and the values obtained were normalized to cell growth (OD600 nm). Pyoverdine concentrations were calculated using a calibration curve of fluorescence of a range of concentrations of pyoverdine (Sigma Aldrich, US).

Yeast killing assay

Yeast (Cryptococcus neoformans KN99 a, Candida albicans ATCC #90028 DAY185 strain or Saccharomyces cerevisiae YJM310 strain) were plated for 2 days on YPD agar (Difco) plates at 30°C. A colony was picked and grown for 18 h in liquid YPD media (Difco) at 30°C with shaking (200 rpm). The yeast was diluted 1:100 in 4 ml soft YPD agar (0.6% agar) and poured onto an YPD plate that was dried for 30 min in a laminar flow hood. A 1 µl drop of an overnight culture of the desired bacterial strain was put on top of the yeast lawn and the plate incubated for 2-3 days at 30°C. A dead yeast zone was formed around a by PA14 bacterial colony bun not around mutants such e.g., $mvfR^-$, $pqsA^-$ and $pqsE^-$. The viability of yeast in these zones was tested by plating yeast from distance of 5 mm from the bacterial colonies on YPD plates.

Fly infection

Fly infection feeding assay was performed as previously described in [58,59]. Briefly, 45 female Oregon-R flies per group, 5-7 days old, were fed with a mixture of 4 ml of LB bacterial culture at OD_{600 nm} 3.0 with 1 ml of 20% sucrose. Thus, feeding mix contained a final concentration of 80% LB containing ~2×10⁹ bacterial cells per ml and 4% sucrose. An autoclaved cotton ball was placed at the bottom of each fly vial and was impregnated with 5 ml of the feeding mix. The 45 flies per treatment group were sub-divided in three fly vials (15 flies in each), sealed with a clean cotton ball, and incubated at 25°C. Fly survival was recorded twice a day until all flies succumbed to the infection. Statistical analysis of the survival curves was preformed using the log-rank test (Mantel-Haenszel) of the Kaplan-Meier estimate of survival using the software MedCale (http://www. medcalc.be/). Two independent experiments gave similar results.

Supporting Information

Figure S1 Transcription profile of mvfR and pqsA-E. The transcription profile was determined from the transcriptome analysis of PA14 cultures along the growth curve in LB at 37°C. Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s001 (0.85 MB EPS)

Figure S2 Microarray data validation. The effect of PqsE on the expression of various differentially-expressed genes in the transcriptome (Table S1) was further confirmed by β-galactosidase assays derived from transcriptional fusions of the tested genes with lacZ (A-C) and by quantitative PCR (D). The levels of pgsA and pqsE gene expression by PCR were determined from PA14 cultures harboring pDN19pqsE (+PqsE) or the control vector pDN19. The PA14 sample at OD600 nm of 2 served as the calibrator.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s002 (1.12 MB EPS)

Figure S3 PqsE and RhlR cooperate in the regulation of the pqs operon and of PqsE downstream genes. (A) A Venn diagram showing the number of genes co-regulated by PqsE (Table S1) and by the Las/Rhl system [42]. (B) Constitutively-expressed PqsE does not reduce the expression of pqsA in a rhlR mutant. The expression of the pqsA gene in an rhlR mutant constitutively expressing PqsE or harboring the empty vector was assessed by



quantitative PCR reaction. An ${\rm OD_{600~nm}}$ reading of a sample from hlR^- served as the calibrator.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s003 (0.82 MB EPS)

Figure S4 pqsE is not required for HAQs production. The levels of HHQ, PQS and HQNO were assessed by LC/MS from PA14 (circles) and pqsE⁻ mutant (squares) cultures at various growth stages in LB at 37°C.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s004 (0.68 MB EPS)

Figure S5 PqsE downregulates pyoverdine production in a RhlR dependent manner. The effect of PqsE and RhlR on pyoverdine production was assessed by measuring the pyoverdine production in PA14 and mutants harboring pDN19pqsE (+PqsE) or the empty vector pDN19 cells as control. Cells were grown in D-TSB medium in 96 wells plate and were incubated at 37°C with shaking for 1 minute every 30 minutes. The results shown are averages of 6 wells.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s005 (4.36 MB EPS)

Figure S6 Iron counteracts PQS-mediated activity. (A) The effect of iron and PQS was assessed by measuring pyocyanin production in PA14 and a PA14 pqsA:: pqsH double-mutant constitutively expressing PqsE. PQS was added at 20 mg/L and iron at 200 μM. Asterisks show samples that are statistical significantly different (P value < 0.01) from the untreated sample of PA14 (*) and pqsA:: pqsH (**). (B) The effect of iron is not a consequence of growth impairment. Growth curves were performed with PA14 cells in D-TSB media supplied with various concentrations of FeCl₃ in 96 wells plate incubated at 37°C with shaking for 1 minute every 30 minutes. The results shown are averages of 6 wells.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s006 (0.93 MB EPS)

Table S1 The PqsE controlled genes list. A list of genes comprising the PqsE regulated genes was generated from our transcriptional data (NCBI GEO accession number #GSE17147). The values represent ratios of differential expression between the pqsE⁻ mutant vs. PA14 (pqsE⁻), mvfR⁻ vs. PA14 (mvfR⁻), mvfR⁻ harboring pDN19pqsE vs. mvfR⁻ with pDN19 (mvfR⁻ + PqsE), mvfR⁻ + pDN19pqsE treated with PQS (20 mg/L) vs. untreated

References

- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu Rev Genet 35: 439–468.
- Joint I, Allan Downie J, Williams P (2007) Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362: 1115–1117.
- Cornelis P (2008) Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology; In: Cornelis P, ed;Horizon Scientific Press, 244.
- Kirisits MJ, Parsek MR (2006) Does Pseudomonas aeruginosa use intercellular signalling to build biolilm communities? Cell Microbiol 8: 1841–1849.
- Schuster M, Greenberg EP (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in Pseudomonas aeruginosa. Int J Med Microbiol 296: 73–81.
- Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in Pseudomonas. FEMS Microbiol Rev 30: 274–291.
- Heurlier K, Denervaud V, Haas D (2006) Impact of quorum sensing on fitness of Pseudomonas aeruginosa. Int J Med Microbiol 296: 93–102.
- Smith RS, Iglewski BH (2003) P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 6: 56–60.
- Dubern JF, Diggle SP (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species. Mol Biosyst 4: 882–888.
- Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC (2005) Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. FEMS Microbiol Rev 29: 935–947.
- Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, et al. (2005) The contribution of MvR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, thlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol Microbiol 55: 998–1014.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, et al. (2004) Analysis of Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-

(mvfR⁻ + PqsE + PQS) and PA14 harboring pDN19pqsE vs. PA14 harboring the empty vector pDN19 (PA14 + PqsE). The expression results were validated using reporter genes and quantitative PCR (Figure S2).

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s007 (0.08 MB PDF)

Table S2 Transcriptional regulators controlled by the MvfR pathway. The data on the differential expression of transcription regulators was adapted from Table S1.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s008 (0.07 MB XLS)

Table S3 The interplay between the pqs operon and iron. The mvfR regulon components controlling (A) or controlled by (B) iron related regulators. (A) The data was adapted from Table S1. The values represent fold changes in the $pqsE^-$ mutant vs. PA14 ($pqsE^-$), $mvfR^-$ vs. PA14 ($mvfR^-$), $mvfR^-$ harboring pDN19pqsE vs. $mvfR^-$ + pDN19 ($mvfR^-$ + PqsE), $mvfR^-$ + PqsE treated with PQS (20 mg/L) vs. untreated ($mvfR^-$ + PqsE + PQS) and PA14 harboring pDN19pqsE vs. PA14 with pDN19 (PA14 + PqsE). (B) Iron related regulators controlling the MvfR regulon component. Fold change in expression of mvfR, pqsA-E and plmAB were retrieved from previously published studies of iron-related conditions and regulators [37], 2 [36], 3 [62], 4 [63].

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s009 (0.07 MB XLS)

Table S4 Strains, plasmids and primers. The *P. aeruginosa* strains, plasmids and primers that were used in this study.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000810.s010 (0.07 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Linda S. Thomashow for the pUCP-A2G2 and pUCP-MS, Tim Tolker-Nielsen for pAC37 and Gloria Soberón-Chávez for pGYMCrhlR Plasmids.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RH GX LGR. Performed the experiments: RH JH GX VD YA BL CA FL. Analyzed the data: RH VD YA ED FL LGR. Contributed reagents/materials/analysis tools: ED FL LGR. Wrote the paper: RH LGR.

- hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 1339–1344.
- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, et al. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 13245–13250.
- Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, et al. (2001) A
 quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a
 LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc
 Natl Acad Sci U S A 98: 14613–14618.
- Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, et al. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8815–8821.
- Xiao G, He J, Rahme LG (2006) Mutation analysis of the Pseudomonas aeruginosa mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. Microbiology 152: 1679–1686.
- Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, et al. (2006) MvfR, a key Pseudomonas arraginosa pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. Mol Microbiol 62: 1689–1699.
- Wade DS, Calfee MIV, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, et al. (2005) Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 187: 4372–4380.
- Gallagher I.A, McKnight SI., Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184: 6472-6480.
- Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M, et al. (2003) The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal molecule overcomes the cell densitydependency of the quorum sensing hierarchy, regulates thl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol Microbiol 50: 29–43.

- McGrath S, Wade DS, Pesci EC (2004) Dueling quorum sensing systems in Pseudomonas aeruginosa control the production of the Pseudomonas quinolone signal (PQS). FEMS Microbiol Lett 230: 27–34.
- Lépine F, Milot S, Déziel E, He J, Rahme LG (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by Pseudomonas aeruginosa. J Am Soc Mass Spectrom 15: 862–869.
- Lépine F, Dekimpe V, Lesic B, Milot S, Lesimple A, et al. (2007) PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia thailandensis. Biol Chem 388: 839–845.
- Soberon-Chavez G, Aguirre-Ramirez M, Ordonez L (2005) Is Pseudomonas aeruginosa only "sensing quorum"? Crit Rev Microbiol 31: 171–182.
- Zaborina O, Lépine F, Xiao G, Valuckaite V, Chen Y, et al. (2007) Dynorphin Activates Quorum Sensing Quinolone Signaling in Pseudomonas aeruginosa. PLoS Pathog 3: e35. doi:10.1371/journal.ppat.0030035.
- Duan K, Surette MG (2007) Environmental regulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. J Bacteriol 189: 4827–4836.
- Wagner VE, Frelinger JG, Barth RK, Iglewski BH (2006) Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. Trends Microbiol 14: 55–58.
- Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, et al. (2005) Recognition of host immune activation by Pseudomonas aeruginosa. Science 309: 774–777.
- Jensen V, Lons D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, et al. (2006) RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. J Bacteriol 188: 8601–8606.
- Guina T, Wu M, Miller SI, Purvine SO, Yi EG, et al. (2003) Proteomic analysis
 of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. J Am Soc Mass
 Spectrom 14: 742–751.
- Gornelis P, Aendekerk S (2004) A new regulator linking quorum sensing and iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 150: 752–756.
- Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, et al. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by Pseudomonas aeruginosa. Microbiology 153: 1318–1328.
- Bollinger N, Hassett DJ, Iglewski BH, Costerton JW, McDermott TR (2001) Gene expression in Pseudomonas aeruginosa: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. J Bacteriol 183: 1990–1996.
- Kim EJ, Wang W, Deckwer WD, Zeng AP (2005) Expression of the quorumsensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. Microbiology 151: 1127–1138.
- Masse E, Arguin M (2005) Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. Trends Biochem Sci 30: 462–468.
- Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil MIL (2002) GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas arruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Mol Microbiol 45: 1277–1287.
- Palma M, Worgall S, Quadri LE (2003) Transcriptome analysis of the Pseudomonas aeruginosa response to iron. Arch Microbiol 180: 374–379.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 176: 2044–2054.
- Vasil ML (2007) How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. Biometals 20: 587–601.
- Cornelis P, Matthijs S, Van Oeffelen L (2009) Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa. Biometals 22: 15–22.
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from Escherichia coli and Pseudomonas. Mol Microbiol 45: 1177–1190.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J Bacteriol 185: 2066–2079.
- Juhas M, Wichlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, et al. (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology 150: 831–841.
- Juhas M, Wiehlmann L, Salunkhe P, Lauber J, Buer J, et al. (2005) GeneChip expression analysis of the VqsR regulon of Pseudomonas aeruginosa TB. FEMS Microbiol Lett 242: 287–295.
- Oglesby AG, Farrow JM, 3rd, Lee JH, Tomaras AP, Greenberg EP, et al. (2008) The influence of iron on Pseudomonas aeruginosa physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. J Biol Chem 283: 15558–15567.
- Bredenbruch F, Geffers R, Nimtz M, Buer J, Haussler S (2006) The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. Environ Microbiol 8: 1318–1329.
- Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, et al. (2007) The Pseudomonas aeruginosa 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. Chem Biol 14: 87–96.
- Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, et al. (2009) Red death in Caenorhabditis elegans caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 6327–6332.
- Vial I., Lépine F, Milot S, Groleau MC, Dekimpe V, et al. (2008) Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline

- analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. J Bacteriol 190: 5339-5352.
- Yu S, Jensen V, Seeliger J, Feldmann I, Weber S, et al. (2009) Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the Pseudomonas quinolone signal (PQS) response protein. Biochemistry 48: 10298–10307.
- Farrow JM, 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP, et al. (2008) PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the nhl quorum-sensing system. J Bacteriol 190: 7043–7051.
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, et al. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 183: 6454–6465.
- Lesic B, Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in Pseudomonas aeruginosa. BMC Mol Biol 9: 20.
- Hogan DA, Kolter R (2002) Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors. Science 296: 2229–2232.
- Kaleli I, Cevahir N, Demir M, Yildirim U, Sahin R (2007) Anticandidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens. Mycoses 50: 74–78.
- Kerr JR (1994) Suppression of fungal growth exhibited by Pseudomonas aeruginosa.
 J Clin Microbiol 32: 525-527.
- Lau GW, Goumnerov BC, Walendziewicz CL, Hewitson J, Xiao W, et al. (2003)
 The Drosophila melanogaster toll pathway participates in resistance to infection
 by the gram-negative human pathogen Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 71:
 4059–4066.
- Apidianakis Y, Pitsouli C, Perrimon N, Rahme L (2009) Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Apidianakis Y, Rahme LG (2009) Drosophila melanogaster as a model host for studying Pseudomonas aeruginosa infection. Nat Protoc 4: 1285–1294.
- Tiburzi F, Imperi F, Visca P (2008) Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 67: 213–227
- Heinrichs DE, Poole K (1996) PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fpt4) expression in Pseudomonas aeruginosa, functions both as an activator and as a repressor. J Bacteriol 178: 2586-2592.
- Juhas M, Eberl L, Tummler B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ Microbiol 7: 459–471.
- Zheng P, Sun J, Geffers R, Zeng AP (2007) Functional characterization of the gene PA2384 in large-scale gene regulation in response to iron starvation in Pseudomonas aeruginosa. J Biotechnol 132: 342–352.
- Girard G, Bloemberg GV (2008) Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Future Microbiol 3: 97–106.
- Bjarnsholt T, Givskov M (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity
 of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem 387:
 409–414.
- Winstanley C, Fothergill JL (2009) The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa infections. FEMS Microbiol Lett 290: 1–9.
- D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, et al. (2007) Growth phenotypes of Pseudomonas aeruginosa lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. Mol Microbiol 64: 512–533.
- Bundy BM, Campbell AL, Neidle EL (1998) Similarities between the antABC-encoded anthranilate dioxygenase and the benABC-encoded benzoate dioxygenase of Acinetobacter sp. strain ADP1. J Bacteriol 180: 4466–4474.
- 69. Urata M, Miyakoshi M, Kai S, Maeda K, Habe H, et al. (2004) Transcriptional regulation of the ant operon, encoding two-component anthranilate 1,2dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of Pseudomonas resinovorans strain CA10. J Bacteriol 186: 6815–6823.
- Haussler S, Becker T (2008) The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in Pseudomonas aeruginosa populations. PLoS Pathog 4: e1000166. 10.1371/journal.ppat.1000166.
- Haas B, Kraut J, Marks J, Zanker SC, Castignetti D (1991) Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. Infect Immun 59: 3997–4000.
- Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 881–941.
- Lesic B, Lépine F, Déziel E, Zhang J, Zhang Q, et al. (2007) Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. PLoS Pathog 3: e126. doi:10.1371/journal.ppat.0030126.
- Rasmussen TB, Givskov M (2006) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int J Med Microbiol 296: 149–161.
- Schweizer HP (1992) Allelic exchange in Pseudomonas aeruginosa using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable Bacillus subtilis sacB marker. Mol Microbiol 6: 1195–1204.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. pp 352–355.
- Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, et al. (2003) Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. J Med Microbiol 52: 403–408.
- Lépine F, Déziel E, Alilot S, Rahme LG (2003) A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Biochim Biophys Acta 1622: 36–41.



- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in Pseudomonas aeruginosa: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. J Bacteriol 172: 884–900.
- 80. Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS (2006) Phenazine compounds in fluorescent Pseudomonas spp. biosynthesis and regulation. Annu Rev Phytopathol 44: 417-445.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Vial, L., Groleau, M. C., Lamarche, M. G., Filion, G., Castonguay-Vanier, J., <u>Dekimpe, V.</u>, Daigle, F., Charette, S. J. & Deziel, E. (2010). Phase variation has a role in *Burkholderia ambifaria* niche adaptation. *ISME J* 4, 49-60. doi:10.1038/ismej.2009.95

Contribution : J'ai participé à la rédaction de l'article ainsi qu'aux expériences nécessitant le LC-MS.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Dekimpe, V. & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155, 712-723.

doi: 10.1099/mic.0.022764-0

Contribution : Rédaction, élaboration des expériences, réalisation des expériences, analyse des résultats.

Cet article est présenté dans le chapitre 1 du présent document.

Vial, L., Lepine, F., Milot, S., Groleau, M. C., <u>Dekimpe, V.</u>, Woods, D. E. & Deziel, E. (2008). *Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis,* and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J Bacteriol* 190, 5339-5352.

Contribution : J'ai participé à la rédaction de l'article ainsi qu'aux expériences nécessitant le LC-MS.

Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria Produce 4-Hydroxy-2-Alkylquinoline Analogues with a Methyl Group at the 3 Position That Is Required for Quorum-Sensing Regulation[∇]

Ludovic Vial, François Lépine, ** Sylvain Milot, Marie-Christine Groleau, Valérie Dekimpe, Donald E. Woods, and Eric Déziel**

INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada,¹ and Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Calgary Health Sciences Centre, 3330 Hospital Drive, NW, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada²

Received 20 March 2008/Accepted 14 May 2008

4-Hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), especially 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (Pseudomonas quinolone signal) and its precursor, 4-hydroxy-2-heptylquinoline, are attracting much attention, mainly because of their role as signaling molecules in Pseudomonas aeruginosa. The pqsABCDE operon is centrally involved in their biosynthesis. The presence of a homologous operon in Burkholderia pseudomallei and B. thailandensis was recently reported. Thus, we have investigated the abilities of 11 Burkholderia species to produce HAQ-like molecules by liquid chromatography/mass spectrometry. We have identified 29 different HAQ derivatives produced by the only three Burkholderia species where a pqsABCDE homologue was found among available sequenced Burkholderia species genomes, including B. ambifaria, a member of the Burkholderia cepacia complex. In contrast with those of P. aeruginosa, Burkholderia HAQs typically bear a methyl group, hence their designation as 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines (HMAQs). We identified three families of HMAQs with a saturated or unsaturated alkyl chain at the 2' position, in contrast with the 1' position of P. aeruginosa, including one with an N-oxide group. Furthermore, the operon in these species contains two more genes downstream of the pqsE homologue, resulting in the hmqABCDEFG operon. While the inactivation of hmqA inhibits the production of HMAQs, the methylation of the quinoline ring requires a putative methyltransferase encoded by hmqG. Interestingly, hmqA or hmqG mutations increase the production of acyl homoserine lactones and, consequently, phenotypes under the control of quorum sensing in B. ambifaria: antifungal activity, siderophore production, and proteolytic activity. These results indicate that only HAQs bearing a methyl group (HMAQs) are involved in quorum-sensing regulation.

Bacteria produce and release an array of secondary metabolites. These molecules possess biological activities that endow the producer with increased fitness to compete with other species, infect various hosts, and colonize diverse ecological niches. 4-Hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), originally named "pyo compounds," have been long known as a class of antimicrobials produced by the opportunistic bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (10, 25, 58). Notably, some of these compounds inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria and even the development of phytoplankton (35, 36). Many HAQs also act as iron chelators (2, 49) and even immune modulants (28). HAQs have recently attracted much attention because of their role as intercellular signaling molecules in *P. aeruginosa* (14, 45).

P. aeruginosa produces a large variety of HAQs belonging to various families characterized by the presence of a hydrogen or hydroxyl group at the 3 position, an N-oxide group in place of the quinoline nitrogen, and an unsaturation on the alkyl side chain (32). Among these compounds, 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (Pseudomonas quinolone signal [PQS]) and 4-hy-

The phnAB operon catalyzes the biosynthesis of anthranilic acid, the primary precursor of HAQs (14). Both pqsABCDE and phnAB are positively controlled by the LysR-type transcriptional regulator MvfR (PqsR) (5, 14, 38), whose coinducing ligands are HHQ and PQS (57, 61). The conversion of HHQ into PQS is mediated by PqsH, a putative monooxygenase not controlled by MvfR (14, 61), while the synthesis of HAQ N-oxides requires the pqsL gene (14). The production and activity of HAQs are part of a sophisticated regulatory network mediated by small intercellular signaling molecules called quorum sensing (QS) (15). QS, which relies on the activation of specific transcriptional regulators by autoinducers functioning as diffusible signals, regulates the expression of factors involved in host-microbe interactions, such as virulence factors (29, 59). In P. aeruginosa, the QS system, via the regulators LasR and RhIR, influences the production of HAQs on

droxy-2-heptylquinoline (HHQ) act as signaling molecules and are implicated in the regulation of the expression of multiple virulence genes in this bacterium (17, 39). The pqsABCDE operon encodes the primary proteins mediating HAQ biosynthesis (Fig. 1) (14, 22). PqsA is probably an anthranilate-coenzyme A (CoA) ligase (33), while pqsB, pqsC, and pqsD encode proteins similar to β -keto-acyl-acyl carrier protein synthases (22). The last gene of the operon, pqsE, is not involved in the biosynthesis of HAQs but is instead required for the cellular response to these compounds (13, 14, 22).

^{*} Corresponding author. Mailing address: INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. Phone for François Lépine: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. E-mail: francois.lepine@iaf.inrs.ca. Phone for Eric Déziel: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. E-mail: eric.deziel@iaf.inrs.ca.

Published ahead of print on 6 June 2008.

FIG. 1. (A) Biosynthetic pathway of HAQs in *P. aeruginosa* and HMAQs in *Burkholderia*. (B) Comparison of the *P. aeruginosa* PA14 (http://pseudomonas.com) region containing the *pqsABCDE* operon with the *B. ambifaria* AMMD region containing the *hmqABCDEFG* operon (http://burkholderia.com). Values represent identities/similarities between the different gene products of these operons. Searches for identity and similarity were performed using the BLAST algorithm (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/). ^a, indicates that, as reported in the text, HmqB exhibits identity/similarity only with the amino-terminal half of PqsB.

hmgD hmgE

hmaF

hmaG

various levels: LasR upregulates the transcription of both mvfR and pqsH, while RhlR represses the transcription of pqsAB-CDE (57, 62). The production, regulation, and functions of HAQs in P. aeruginosa are thus under intense scrutiny in order to obtain a better understanding of virulence expression in this bacterium.

Bamb-5762

hmqA

B. ambifaria AMMD

hmqB

hmaČ

Formerly included in the pseudomonad family, the *Burkholderia* genus, of the *Betaproteobacteria*, comprises more than 40 species that inhabit remarkably diverse ecological niches, as they have been isolated from soil, plant rhizosphere, water, insects, fungi, hospital environments, and infected humans. Many *Burkholderia* species have developed beneficial interactions with their plant hosts and have considerable ecological importance: several species of *Burkholderia* have proven to be very efficient biocontrol and bioremediation agents (7, 53). In contrast, a number of *Burkholderia* species, especially members of the *Burkholderia cepacia* complex, are also increasingly prevalent opportunistic human pathogens that cause severe respi-

ratory infections in people suffering from cystic fibrosis (CF) or chronic granulomatous disease (8). In addition, two other species, B. mallei and B. pseudomallei, are well-characterized primary pathogens of animals and humans. B. mallei is the etiological agent of glanders, which is mainly a horse disease but affects humans in rare cases (44). The saprophyte B. pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a potentially fatal septicemic infection of animals and humans (6). B. thailandensis is very closely related to B. pseudomallei but is generally considered to be avirulent (4).

Bamb-5770

Not surprisingly, these versatile bacteria release a large variety of extracellular products including proteases, siderophores, toxins, antifungals, and antimicrobials, many of which are under QS control (56). While many *Burkholderia* strains, including *B. ambifaria*, carry only one QS system homologous to the *P. aeruginosa* Las and Rhl systems, some strains, such as *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*, harbor five different QS transcriptional regulators and three acyl homo-

TABLE 1. Burkholderia strains used in this study

Strain ^a	Source and location	Reference or source	
B. cepacia (gen. I) LMG1222	Onion, United States	37	
B. cepacia (gen. I) LMG18821	CF, Australia	37	
B. multivorans (gen. II) LMG17588	Soil, United States	37	
B. multivorans (gen. II) LMG16660	CF, United Kingdom	37	
B. cenocepacia (gen. III) LMG19240	Wheat, Australia	55	
B. cenocepacia (gen. III) J2315	CF, United Kingdom	37	
B. cenocepacia (gen. III) LMG18830	CF, Australia	37	
B. stabilis (gen. IV) LMG18870	CF, Canada	37	
B. vietnamiensis (gen. V) LMG22486	Water treatment, United States	43	
B. vietnamiensis (gen. V) LMG18835	CF, United States	37	
B. dolosa (gen. VI) LMG21819	CF, United States	9	
B. dolosa (gen. VI) LMG21443	Root, Senegal	9	
B. ambifaria (gen. VII) HSJ1	CF, Canada	This study	
B. pyrrocinia (gen. IX) LMG21824	CF, United Kingdom	9	
B. thailandensis E264	Soil, Thailand	4	
B. mallei ATCC 23344	Mule, China	12	
B. pseudomallei 1026b	Clinical isolate	11	

^a For B. cepacia complex strains, genomovar (gen.) status is indicated in parentheses.

serine lactone (AHL) synthases (19). Evidence that the QS systems operating in *Burkholderia* are crucial for full virulence in various animal models has accumulated over the past few years.

With the help of a bioassay, HAQs similar to those produced by P. aeruginosa were recently detected in concentrated extracts of B. pseudomallei and B. thailandensis cultures (16). We have investigated the abilities of Burkholderia species to produce HAQ-like molecules. The present work describes the precise identification of the distinct HAQ derivatives produced by three Burkholderia species, including B. ambifaria, a member of the B. cepacia complex, and unique insights into their biosynthetic pathway. We found that in contrast with those of P. aeruginosa, Burkholderia HAQs contain predominantly an unsaturated aliphatic side chain and are typically methylated (at the 3 position), hence their designation as 4-hydroxy-3methyl-2-alkylquinolines (HMAQs). This methylation results from the presence of a putative methyltransferase encoded by the last gene of the hmqABCDEFG operon. Finally, we show that the synthesis of HMAQs negatively regulates the production of AHLs in B. ambifaria and consequently modulates QS-regulated phenotypes.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and culture conditions. Burkholderia strains used in this study are shown in Table 1. Escherichia coli SM10 λpir (thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km² λρir) served as a donor for conjugation experiments (51). Unless otherwise stated, B. thailandensis and B. cepacia complex strains were routinely grown in tryptic soy broth (TSB) (Difco) at 37°C with shaking (240 rpm) or on TSB agar plates. B. pseudomallei strain 1026B and B. mallei strain ATCC 23344 were grown with shaking (200 rpm) in LB broth (Difco) for 36 h at 37°C. When required, chloramphenicol was used at 40 μg/ml for B. ambifaria HSJ1 and at 100 μg/ml for B. thailandensis E264.

Feeding experiments with labeled anthranilic acid were performed by supplementing cultures at an optical density at 600 nm [OD₆₄₀] of 2.0 with 20 mg/liter 3,4,5,6-tetradeutered anthranilic acid. The experiment with ¹⁵N-anthranilic acid (CDN isotopes) was performed in the same way but with 50 mg/liter. Experiments with tryptophan were performed in M63 medium plus 0.1% dextrose supplemented with 10 mg/liter 2',4',5',6',7'-pentadeutered 1.-tryptophan (CDN isotopes).

Assays with 6-FABA. Anthranilic acid analogue 6-fluoro-2-aminobenzoic acid (6-FABA) stock was prepared at a concentration of 300 mM in methanol. B.

ambifaria cells were grown as previously described in TSB minus or plus 6-FABA. Concentrations of 0.25 mM, 0.5 mM, and 1 mM were tested. Samples were taken when the maximum production of HMAQs is normally achieved (stationary phase) and prepared for liquid chromatography (LC)/mass spectrometry (MS) analysis as explained below. Cultures were performed in triplicate.

The competing concentration of anthranilic acid used for complementation was twice that of the analogue. Samples were taken at the beginning of the exponential phase and prepared for LC/MS analysis. Cultures were performed in triplicate.

Construction of hmqA and hmqG mutants. Briefly, a 757-bp internal fragment of hmqA and a 525-bp fragment of hmqG were amplified from B. ambifaria HSJ1 using primers hmqAKOF, with an XbaI site (Table 2), and hmqAKOR, with a KpnI site, for the hmqA gene and using primers hmqGR and hmqGF with the same restriction sites for the hmqG gene. The PCR products were digested with KpnI and XbaI and ligated into the XbaI and KpnI sites of the suicide vector pKNOCK-Cm (1). The construct was then electroporated in E. coli SM10 cells. The resulting plasmid was mobilized from E. coli SM10 into B. ambifaria HSJ1 cells by mating. Single-crossover insertion mutants were selected on TSB agar containing 20 μg/ml gentamicin and 40 μg/ml chloramphenicol. The insertion of the plasmid into the target gene was confirmed by PCR.

The same procedure was used for the construction of the *B. thailandensis* E264 *limqA* mutant: a 788-bp internal fragment of *limqA* was amplified from E264 using primers hmqTKOF, with a KpnI site, and hmqTKOR, with an XbaI site, and cloned into the XbaI and KpnI sites of pKNOCK-Cm. Single-crossover insertion mutants were selected on TSB agar containing 20 µg/ml gentamicin and 100 µg/ml chloramphenicol.

LC/MS analyses. For HAQ quantification, culture samples were prepared, as described previously (14, 31), by adding methanol containing 20 mg/liter internal standard (PQS-d₄ [5,6,7,8-tetradeutero-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline]) to culture samples for a final concentration of 50%. The mixture was centrifuged for 10 min, and the supernatant was collected for analysis. For *B. pseudomallei* 1026b and *B. mallei* GB8, cell-free supernatants were obtained by centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min. Five milliliters of the supernatants was acidified by the addition of glacial acetic acid (20 μ l/ml medium), and this was extracted three times with ethyl acetate (1:1, vol/vol); the extracts were combined and evapo-

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'-3') ^a
hmqAKOF	GCTCTAGAGCAAGTTCGACGCTACGAGACG
hmqAKOR	GGGGTACCCCAGGTTCCAGCCGTACTTGAC
hmqTKOF	GGGGTACCCCGGTGCTACGACACTGAAGA
hmqTKOR	GCTCTAGAGCTAGCCGTCCTCGTCCAGATA
hmqGF	CTAG <u>TCTAGA</u> CTAGTTGTGGACCAGGAACATGAA CGG <u>GGTACC</u> CCGTTGCTCGACGAACTCCTGT

[&]quot; Restriction sites designed into the primers are underlined.

5342 VIAL ET AL. J. BACTERIOL.

rated at 35°C under a gentle stream of nitrogen. The residue was then resuspended in 5 ml of methanol. For AHL quantification, 480 µl of culture samples was mixed with 120 µl of acetonitrile containing 50 mg/liter of internal standard (PQS-d₄) for a final concentration of 10 mg/liter.

The analyses were performed with a Quattro II (Waters, Mississauga, Ontario, Canada) triple-quadrupole mass spectrometer in positive electrospray ionization mode. Collision-induced dissociation was performed with argon as the collision gas at 2×10^{-3} mTorr. The mass spectrometer was coupled to an HP 1100 (Agilent Technologies, Saint Laurent, Quebec, Canada) high-performance liquid chromatograph equipped with a 3- by 150-mm C₈ Luna (Phenomenex, Torrance, CA) reverse-phase column. The flow rate was 0.4 ml/min split to 10% through a Valco Tee. A water-acetonitrile gradient with 1% acetic acid was used as the mobile phase. Analysis of all the HMAQs and HAQs was performed in full scan mode using the response factor of 4-hydroxy-3-methyl-2-nonenylquinoline (HMNQ) and using PQS-d4 as an internal standard (31). Assays of cultures were carried out in triplicate, and detailed quantification of HMAQs/HAQs was performed at the time of maximum production of HMAQs (for B. ambifaria and B. thailandensis) or at the early stationary phase (B. pseudomallei). For B. pseudomallei and B. mallei, a single analysis was made from cultures sampled at 18 and 36 h, respectively. For AHL, data acquisition was performed in full scan mode with a scanning range of 130 to 350 Da. The precise quantification of C₈-HSL was performed with tandem MS (MS/MS) as described previously (13).

NMR. HMNQ was dissolved in deuterochloroform for nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. The NMR apparatus was a Bruker SpectroSpin model operating at 500 MHz.

Phenotype assays. Antifungal and proteolytic activities of the culture supernatants were measured by a zone-of-inhibition assay. Proteolytic and antifungal activities were evaluated on agar plates containing 1% skim milk powder and on TSB agar plates inoculated with 100 μ l of Candida albicans culture, respectively. Briefly, B. ambifaria strains were grown in TSB until an OD₆₀₀ of 5.0 (end of the exponential phase) was achieved. After centrifugation and filter sterilization supernatant samples were loaded into wells made by removing agar plugs. The plates were incubated for 24 h at 30°C. Antifungal and proteolytic activities were estimated from the area (mm²) of the inhibition zone surrounding the wells. This experiment was performed in triplicate and repeated twice with similar results.

Siderophore production was determined by use of the Chrome Azurol S (CAS) assay. On CAS agar, siderophores remove iron from the CAS dye complex, resulting in a blue-to-orange color change in zones surrounding the colonies (50). B. ambifaria strains were grown in TSB until an OD_{600} of 2.0 was reached and were spotted (3 μ l) onto CAS agar. The plates were incubated for 24 h at 37°C. The production of siderophores was estimated by measuring the area of the halo (mm²) surrounding the colonies. After 24 h, the number of CFU present in each colony was determined by plating serial dilutions on TSB agar, and siderophore production values were corrected for the number of CFU. Eight colonies per strain were examined, and the experiment was repeated twice, with similar results.

RESULTS

Homologues of the pqsABCDE operon in Burkholderia species. A search for pqsABCDE homologues in completed and uncompleted Burkholderia genome sequences (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) confirmed the presence of homologues to these genes arranged as a putative operon on chromosome II of B. pseudomallei (BPSS00481 to BPSS00485 for strain K96243) and B. thailandensis (BTH_II1935 to BTH II1931 for strain E264), as recently reported (16). B. oklahomensis, a new species closely related to B. pseudomallei (23), was also found to contain a putative pqsABCDE operon. We noticed pasABCDE homologues in all available sequenced B. pseudomallei, B. thailandensis, and B. oklahomensis strains. Interestingly, in silico analysis of the sequenced B. mallei genomes indicates that this species, while closely related to B. pseudomallei, does not carry this putative operon arrangement. Furthermore, we also found a corresponding putative operon on chromosome III of the biocontrol B. ambifaria strain AMMD, which belongs to the B. cepacia complex as genomovar VII (Fig. 1) (7). This region displays a GC content of 66.4%, a

typical value for the *B. cepacia* complex. Compared with *P. aeruginosa* PA14 *pqsABCDE* gene products, *B. ambifaria* AMMD gene products exhibit from 31% identity for the homologue of PqsA to 54% identity for the homologue of PqsD. Interestingly, however, the second open reading frame of the *B. ambifaria* AMMD operon encodes a protein showing 40% identity with only the first 150 amino acids of PqsB, the region containing a domain similar to β-keto-acyl-acyl carrier protein synthases. This putative operon is well conserved among the various *Burkholderia* strains carrying it and demonstrates a high level of protein sequence identity. For example, between *B. ambifaria* AMMD and *B. pseudomallei* K96243, protein identities range from 59% for the PqsB homologues to 84% for the PqsD homologues. A search for *pqsH* confirmed the absence of homologues in these *Burkholderia* species.

In several other *Burkholderia* genomes, especially strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex and *B. mallei*, putative homologues of *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, and *pqsD* are found dispersed throughout the genomes, but none carries a homologue of *pqsE*, which encodes the response effector.

Apart from the homology with pqsABCDE, the genomic context surrounding this operon is quite different in these bacteria compared with P. aeruginosa. The phnAB operon, encoding anthranilate synthase, is not found near pqsABCDE homologues or elsewhere in the genomes. Furthermore, no homologue of mvfR, which codes for the transcriptional regulator of pqsABCDE and phnAB in P. aeruginosa, is present in close vicinity of the Burkholderia pqsABCDE homologues. Instead, this operon contains two additional genes at the end in all strains of Burkholderia where a putative pqsABCDE operon was identified. In silico analysis did not reveal the presence of a putative promoter upstream from these two open reading frames. These two genes are well conserved among the strains of Burkholderia carrying the pqsABCDE homologues, e.g., 72% and 75% identity, respectively, between the B. ambifaria AMMD and the B. pseudomallei K96243 homologues. Homologues to these two genes are not found in any other sequenced Burkholderia or P. aeruginosa species. In B. ambifaria and B. thailandensis, we confirmed their inclusion as part of the polycistronic operon by reverse transcription-PCR (data not shown). Accordingly, a GC-rich hairpin-forming sequence followed by several thymines, which could function as a transcriptional terminator, lies only at the 3' end of the last gene of this operon in B. ambifaria AMMD.

Because HAQ derivatives produced by these bacteria are usually methylated (as described below) and are thus responsible for the synthesis of HMAQs, we named this operon *hmqABCDEFG*, with *hmqF* and *hmqG* as the two additional genes (Fig. 1).

LC/MS and LC/MS/MS identification and characterization of HMAQs produced by Burkholderia species. We tested the following Burkholderia species for the production of HAQ derivatives: B. pseudomallei, B. thailandensis, B. mallei, and 14 other strains covering most of the species belonging to the B. cepacia complex (Table 1). HMAQs were found only in cultures of the species carrying an hmqABCDEFG operon: B. pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria.

The reconstructed total-ion chromatogram (TIC) obtained from the supernatant of *B. thailandensis* cultivated until the maximum production of HMAQs was achieved reveals a large

		R=	[M + H]+	Ret.a	Bab	Bt ^c	Bpd
		C ₅ H ₉	228	14.77	1.00 (0.06)*	ND	0.027
	он	C ₆ H ₁₁	242	16.37	0.55 (0.08)	ND	ND
		H ₃ C ₇ H ₁₃	256	18.00	58.80 (5.20)	0.79 (0.09)	0.102
Ų,		C ₈ H ₁₅	270	19.65	1.50 (0.15)	ND	0.044
V	N F	C ₉ H ₁₇	284	21.17	27.73 (2.49)	17.59 (2.95)	1.87
	FAMILY A HMAQ: 2'	C10H19	298	22.18	0.02 (0.00)	ND	0.088
	_	C11 H21	312	24.38	ND	0.15 (0.04)	0.014
	ОН	C₅H₁₁	230	15.85	0.25 (0.02)	ND	ND
	1	H ₃ C _B H ₁₃	244	17.70	0.03 (0.01)	ND	ND
	YY	C ₇ H ₁₅	258	19.46	3.23 (0.32)	0.08 (0.01)	0.005
	人 _N 人 _R	C ₈ H ₁₇	272	21.28	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)	ND
	FAMILY B	C ₉ H ₁₉	286	23.00	4.88 (0.46)	0.065 (0.11)	ND
DATE	ACATED IIIIA	C ₁₀ H ₂₁	300	24.73	0.04 (0.01)	ND	ND
	ρH	C _B H ₁₁	258	15.67	ND	ND	0.002
	√√°	H ₃ C ₇ H ₁₃	272	16.95	ND	ND	0.024
		C ₈ H ₁₅	286	18.62	ND	0.22 (0.03)	0.068
	N R	C ₉ H ₁₇	300	20.36	ND	4.29 (0.46)	0.68
F	SAMILY C	C ₁₀ H ₁₉	314	21.38	ND	0.01 (0.00)	0.005
HMA	Q: 2' N-OXIDE		328	22.40	ND	0.04 (0.00)	0.006
	OH I	C ₆ H ₁₃	230	16.04	ND	ND	ND
		C,H15	244	17.98	0.05 (0.01)	ND	ND
	人人	C ₈ H ₁₇	258	19.89	0.01 (0.00)	ND	ND
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	N R AMILY D	C ₉ H ₁₉	272	21.94	0.09 (0.01)	ND	ND
	RATED HAQ	C ₁₀ H ₂₁	286	24.00	ND	ND	ND
	ОН	C ₇ H ₁₃	242	17.01	0.37 (0.02)	ND	ND
		C _B H ₁₅	256	18.18	ND	ND	ND
		C ₉ H ₁₇	270	19.35	0.15 (0.02)	0.09 (0.02)	ND
~ <u></u>	N R	C ₁₀ H ₁₉	284	20.73	ND	ND	ND
	AMILY E HAQ : 2'	C ₁₁ H ₂₁	298	22.44	0.02 (0.00)	0.07 (0.02)	ND

FIG. 2. Chemical structures, retention times, and concentrations (mg/liter) of the various congeners of the five families of HMAQs and HAQs identified in *Burkholderia* cultures. ^a, chromatographic retention time (Ret.) (minutes); ^b, *B. ambifaria* (Ba); ^c, *B. thailandensis* (Bt); ^d, *B. pseudomallei* (Bp); ^e, standard deviations of triplicate assays (in parentheses); ^f, not detected.

number of peaks dominated by one presenting a pseudomolecular ion at m/z 284. The corresponding molecule was isolated by flash chromatography and by high-performance LC, and its NMR was found to correspond to HMNQ, including the *trans* configuration of the double bond between the 2' and 3' carbons of the side chain (42). The MS/MS spectrum of HMNQ shows an intense ion at m/z 173 along with other ions of decreasing intensities at m/z 184, 186, 198, and 212. Having characterized this compound, we found two other compounds with pseudomolecular ions at m/z 256 and 312 that present the same MS/MS spectra as HMNQ. In addition to these three compounds, four additional ones are found, which present pseudomolecular ions at m/z 228, 242, 270, and 298 in B. ambifaria culture supernatants. They present the same MS/MS

spectra as HMNQ and occur at regular intervals in the TIC chromatograms. All these characteristics are typical of compounds belonging to a family of molecules sharing a common structure and differing from one another by 14 Da, which corresponds to the addition of a methylene unit on a side chain (Fig. 2). B. pseudomallei also produces many molecules belonging to family A (Fig. 2).

Having isolated pure HMNQ, we could determine its response factor under our analytical conditions. The concentrations of the members of this family and of all the other families of HMAQs were hence determined using this response factor. While the main HMAQ is HMNQ (m/z 284) in B. thailandensis, it is 4-hydroxy-3-methyl-2-heptenylquinoline (m/z 256) in B. ambifaria (Fig. 2). The HMAQ production kinetics for B. am-

5344 VIAL ET AL. J. BACTERIOL.

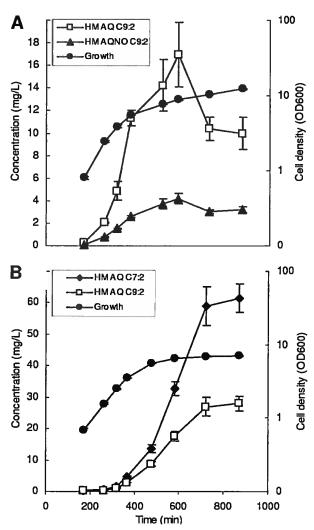


FIG. 3. Production in function of growth of the major HMAQs produced by *B. thailandensis* (A) and *B. ambifaria* (B). Production was monitored until the stationary phase was reached. Error bars represent the standard deviations of data for triplicate cultures.

bifaria and B. thailandensis performed with this response factor reveal distinct and characteristic production patterns (Fig. 3).

Most of the family B congeners, which display pseudomolecular ions at m/z 230, 244, 258, 272, 286, and 300, were found in B. ambifaria and B. thailandensis supernatants (Fig. 2). They also occur at regular intervals in the TIC chromatogram, and their MS/MS spectra all display ions at m/z 173, 186, and 200. The molecular weights of these compounds indicate that they are saturated analogues of the compounds belonging to the unsaturated HMAQ family A with a C_5 -to- C_{10} side chain. Fewer members of family B are produced and at lower concentrations in B. thailandensis than in B. ambifaria, while only minute amounts of the C_7 congener are found in B. pseudomallei cultures (0.005 mg/liter).

In order to confirm that the double bond of the other members of family A is indeed between the 2' and 3' carbons of the side chain, as in HMNQ, and to further support the hypothesis that compounds from family B are saturated analogues of family A, the culture supernatants were hydrogenated using deuterium gas. The ions at m/z 228, 242, 256, 270, 284, 298, and 312 disappeared and new ions appeared at m/z 232, 246, 260, 274, 288, 302, and 316 at the same retention time as those of their corresponding saturated analogues. The MS/MS spectra of these deuterated compounds all presented fragment ions at m/z 173, 187, and 202. These results confirmed the hypothesis that family B congeners are linear saturated analogues of family A.

Cultures of B. thailandensis and B. pseudomallei also contain another family of congeners (family C) presenting pseudomolecular ions at m/z 272, 286, 300, 314, and 328 (Fig. 2). The molecular masses of these ions are 16 Da higher than those of the corresponding congeners of family A, indicating that they could be analogues of HMNQ containing an N-oxide and an unsaturated alkyl chain in C7, C8, C9, C10, and C11. Their MS/MS spectra present fragment ions at m/z 172, 173, 184, 186, and 198. Upon treatment of the B. thailandensis supernatant with zinc in acetic acid, conditions known to reduce N-oxides, these pseudomolecular ions disappeared, and the levels of pseudomolecular ions of family A increased, supporting the hypothesis that family C congeners are N-oxide derivatives. Interestingly, no family C congeners are produced by B. ambifaria. Since in P. aeruginosa, the production of HAQ Noxides requires the presence of past (32), we analyzed the Burkholderia genomes and found genes coding for proteins with a very good level of homology to PqsL in B. pseudomallei K96243 (BPSS0829) (52% identity and 64% similarity) and B. thailandensis E264 (BTH II1576) (51% identity and 65% similarity) but, consistently, none in B. ambifaria.

HHQ along with its saturated C₈ and C₉ congeners (family D), typically produced by P. aeruginosa, are found only in B. ambifaria cultures and at very low levels (Fig. 2). However, another family of congeners presenting pseudomolecular ions at m/z 242, 270, and 298 (family E) was detected in B. thailandensis and B. ambifaria but not in B. pseudomallei (Fig. 2). These congeners are structurally related to family D but with an unsaturated C7, C9, and C11 side chain. The retention times of these compounds are slightly different from those bearing the double bond between the 1' and the 2' carbons of the side chain, such as those produced by P. aeruginosa, an indication that the double bond could be located further along the chain. In B. ambifaria cultures treated with deuterium, the pseudomolecular ions at m/z 242 and 270 disappear, and two new ions are observed at m/z 246 and 274 at the corresponding retention times of C₇ and C₉ saturated congeners. Their MS/MS spectra present ions at m/z 159 and 173. A single C₀ HAQ congener containing a double bond at the 1'-2' position was detected in B. pseudomallei but at a very low concentration (0.02 mg/liter).

Importantly, and similarly to a pqsA mutation in P. aeruginosa, knocking out hmqA in B. thailandensis and B. ambifaria completely abrogated the production of all five families of HAQ derivatives, in agreement with the proposed role of the hmq operon in the synthesis of these molecules.

Anthranilic acid is the precursor of HMAQs. In order to verify that *hmq* operon-carrying bacteria derive all HMAQs from anthranilic acid, like *P. aeruginosa*, we fed *B. thailandensis* and *B. ambifaria* cultures with deuterium-labeled anthranilic acid. Upon LC/MS analysis of the cultures, all the ions assigned to HMAQ or HAQ congeners displayed the expected

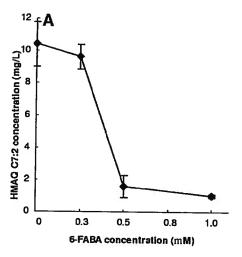
addition of 4 Da to their pseudomolecular ions, confirming the incorporation of anthranilic acid into their structures. Feeding with ¹⁵N-anthranilic acid led to an increase of 1 Da in all the pseudomolecular ions mentioned above, indicating that the nitrogen of anthranilic acid is also incorporated into all HMAQ and HAQ congeners. This 1-Da increase was also found in all the MS/MS fragment ions mentioned above.

Interestingly, we noticed that anthranilic acid accumulates in hmqA mutant cultures (at an OD₆₀₀ of 6.0 [0.16 mg/liter for the wild type versus 8.13 mg/liter for the hmqA mutant of B. thailandensis]), suggesting that a source of excess anthranilate is available in these Burkholderia strains, contributing to the synthesis of HMAQs. In P. aeruginosa, three sources supply anthranilic acid to the cellular pool for HAQ synthesis: the anthranilate synthases TrpEG and PhnAB and the kynBUAencoded kynurenine pathway, which provides anthranilic acid through the degradation of tryptophan (Fig. 1) (20). Although B. ambifaria and B. thailandensis do not seem to carry PhnAB homologues, anthranilate synthase trpEG genes are present (Bamb_0439 and Bamb_0438 for trpE and trpG, respectively, in B. ambifaria AMMD), and a complete set of kynBUA genes is found as a cluster on the Burkholderia genomes (Bamb_2625 to Bamb_2627 in B. ambifaria AMMD). To verify whether the kynurenine pathway contributes to HMAQ synthesis, we fed B. ambifaria and B. thailandensis cultures with deuterium-labeled tryptophan, and this led to the labeling of all HMAQs in both bacteria. This showed that tryptophan degradation via the kynurenine pathway provides at least part of the anthranilic acid pool used for HMAQ synthesis (data not shown).

We recently reported that halogenated anthranilic acid analogues inhibit the synthesis of HAQs in *P. aeruginosa* and *B. thailandensis*, presumably by targeting the function of PqsA and/or HmqA (33). We therefore tested the effect of the anthranilic acid analogue 6-FABA on *B. ambifaria* cultures. The level of production of HMAQs decreased with increasing concentrations of 6-FABA added to the culture (Fig. 4A). Furthermore, the exogenous addition of anthranilic acid partially complemented this inhibition (Fig. 4B), supporting the hypothesis that HmqA is the target of 6-FABA in *B. ambifaria*. 6-FABA similarly inhibits *B. thailandensis* HMAQ production (data not shown).

HmqG is required for the addition of the methyl group at the 3 position of HMAQs. Since the hmq operon produces molecules similar to those from the pqs operon, we hypothesize that HmqA, HmqB, HmqC, HmqD, and HqmE perform functions similar to those of their homologous proteins in P. aeruginosa. However, the hmq operon presents two supplemental genes downstream of hmqE, which have no homologues in P. aeruginosa. We therefore performed BLAST analyses and conserved-domain investigations to obtain hints as to the function of the products of hmqF and hmqG, the two last genes of the Burkholderia hmq operons.

hmqF (Bamb_5768 and BTH_II1930) encodes a protein of 1,292 amino acids showing homology with several putative AMP-dependent synthetases and ligases and several putative nonribosomal peptide synthetases. Analysis of HmqF protein motifs and conserved domains in the Pfam 22.0 database (http://pfam.janelia.org/) revealed that this putative protein contains several conserved domains: an N-terminal region showing homology to the AMP-binding enzyme family (PF00501),



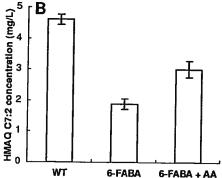


FIG. 4. Inhibition of HMAQ production by an analogue of anthranilic acid. (A) Production of HMAQ C₇:2' by *B. ambifaria* decreases with increasing concentrations of 6-FABA. (B) Exogenous anthranilic acid addition partially restores HMAQ C₇:2' production by *B. ambifaria* in the presence of 6-FABA. AA, anthranilic acid.

two predicted acyl-CoA dehydrogenase domains (PF02770 and PF00441), and a predicted phosphopantetheine attachment site in the C-terminal region (PF00550).

Interestingly, the same analysis for HmqG (712 amino acids) revealed the presence of a predicted methyltransferase domain (PF08242) that is part of the S-adenosyl-L-methionine (SAM)dependent methyltransferase family. Therefore, we hypothesized that HmqG might be involved in the methylation at the 3 position of HMAQs. Accordingly, in a B. ambifaria hmqG mutant culture, the two major ions at m/z 256 and 284 (unsaturated HMAQ) disappear and are replaced by two intense ions at m/z 242 and 270 occurring at a retention time corresponding to those of C7 and C9 unsaturated HAQs of family E. This is consistent with the loss of the methyl group of the corresponding HMAQ congeners, supporting the hypothesis that HmqG acts as a methyltransferase, adding a methyl group at the 3 position of HAQs. Accordingly, the inactivation of hmqG results in the complete absence of methylation on the HMAQs normally produced (loss of families A, B, and C), with an accumulation of the unmethylated molecules (families D and E) (Table 2).

Effect of HMAQs on QS-regulated phenotypes and production of AHLs. Very few QS-regulated functions have so far been identified in *B. ambifaria*. These functions include the

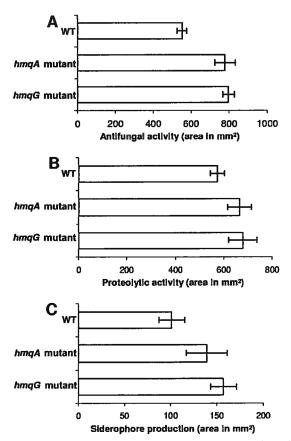


FIG. 5. Effect of hmqA and hmqG mutations on QS-regulated factors. (A) Antifungal activity against C. albicans. (B) Proteolytic activity. (C) Siderophore production. Proteolytic and antifungal activities were estimated from the areas of the clear zones surrounding wells containing supernatants of cultures. The values shown are the averages \pm standard deviations for triplicate cultures. Siderophore production was estimated from the area of the halo surrounding colonies on CAS agar after 24 h at 37° C. The values shown are corrected for the number of CFU in the colony (10^{8}) and are averages \pm standard deviations of data for eight colonies.

production of extracellular proteases, siderophores, and an unknown antifungal compound (60). We investigated whether these QS-regulated phenotypes are affected by HMAQ production. The *hmqA* mutant shows increased siderophore production and proteolytic and antifungal activities compared to those of the wild type (Fig. 5). Results obtained with *C. albicans* were further confirmed with the same bioassay using *Cryptococcus neoformans* and *Candida glabrata*. In both bioassays, a strain deficient in HMAQ synthesis produced larger amounts of antifungal compounds (data not shown). Also, colonies of the *hmqA* mutant showed higher levels of protease activity on agar plates containing 1% skim milk powder and 0.2% yeast extract than did the wild type (data not shown).

As several QS-regulated phenotypes are upregulated in an *hmqA* mutant background, we reasoned that the production of octanoyl homoserine lactone (C₈-HSL), the predominant AHL produced by *B. ambifaria* (63), would be altered. Indeed, as shown in Fig. 6, the absence of HMAQs correlates with a significant increase in levels of C₈-HSL production. At the end of the exponential phase, the concentration of C₈-HSL de-

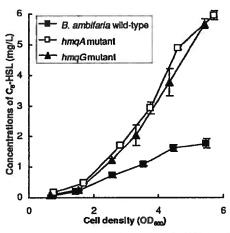


FIG. 6. Production in function of growth of C_8 -HSL by wild-type B. ambifaria and hmqA and hmqG mutants. Error bars represent the standard deviations of data for triplicate cultures.

tected in the supernatant of the *hmqA* mutant strain was twofold higher than that observed for wild-type *B. ambifaria* (Fig. 6).

Results obtained for phenotypic assays and the production of AHLs in the lmqG mutant, which produces only unmethylated molecules, are identical to those obtained for the lmqA mutant. These results suggest that the unmethylated HAQs are not implicated in QS regulation in B. ambifaria. Collectively, these findings indicate that only the methylated HAQs produced by B. ambifaria (HMAQs) participate in the negative regulation of C_8 -HSL production and consequently modulate QS-regulated phenotypes.

DISCUSSION

The homologue of pqsABCDE in Burkholderia species. B. thailandensis and B. pseudomallei were recently reported to produce HAQs similar to those produced by P. aeruginosa (16). The importance of these versatile molecules, especially as coinducing signals in QS for the regulation of virulence in the latter bacterium, prompted us to investigate the nature and diversity of HAQ-related molecules produced by the Burkholderia genus. We searched for the presence of a pqsABCDE operon homologue in available sequenced genomic data. Like Diggle et al. (16), we confirmed the presence of homologues of the pqsABCDE genes in an operon arrangement in B. pseudomallei and in the genetically related species B. thailandensis, but we also identified another species carrying a similar operon, B. ambifaria, a member of the B. cepacia complex. Our hypothesis was that bacteria would be producers of HAQ derivatives only when carrying homologues of the pqsABCDE genes in an operon arrangement as in P. aeruginosa. Of the 11 related Burkholderia species tested, only those three produce HMAQs, supporting our hypothesis.

Moreover, we showed that the operon found in the Burk-holderia strains mentioned above contains two more genes downstream of the gene homologous to pqsE that we thus named hmqF and hmqG. Apart from the homology with pqsABCDE, the genomic context surrounding hmqABCDEFG is quite different in these bacteria compared to P. aeruginosa.

No anthranilate synthase reminiscent of *phnAB* is found nearby, and no homologue of the gene coding for the MvfR transcriptional regulator is present in the vicinity of the *hmq* operon. Furthermore, no putative LysR box seems to be present within the promoter of the *hmqABCDEFG* operon.

Chemical analysis of HMAQs. While we actually found only traces of P. aeruginosa-type HAQs (family D), we observed that the principal products in hmqABCDEFG-carrying Burkholderia species are HAQ analogues methylated at the 3 position. After a detailed analysis of the literature, we were able to find that bacterially produced methylated HAQs with an unsaturated aliphatic side chain had been detected previously. 4-Hydroxy-3-methyl-2-heptenylquinoline from an uncharacterized Pseudomonas strain was identified (24) and was later found in various B. cepacia (unidentified genomovar) strains (48) along with HMNQ (27) and a series of congeners from family B (41). As with P. aeruginosa HAQs, HMAQs are produced as mixtures of various congeners with an alkyl chain of variable length with or without an unsaturation and/or an Noxide function on their quinoline amino group. In order to ascertain the structures of these compounds, we first used high-performance LC to isolate the most abundant HMAQ congener produced by B. thailandensis, as its TIC chromatogram shows predominantly one major congener, compared with B. ambifaria, which produces a greater diversity of compounds. The compound isolated was determined to be HMNQ by NMR. This analytical tool confirmed that the double bond is in the trans configuration. Considering that each congener of family A with a given m/z value appears at only one retention time, and considering the regular intervals between the retention times of the various congeners of this family, we assume that all the other unsaturated HMNQ congeners also share this trans configuration.

The fragmentation patterns of the pseudomolecular ions of the unsaturated HMAQs and the unsaturated HAQs (32) are quite similar, although the double bond is between the 2' and 3' carbons in the former and between the 1' and 2' carbons in the latter. The two most abundant ions of the MS/MS spectra of unsaturated HMAQ family A are at m/z 173 and 186, which correspond to the m/z 159 and 172 ions observed for unsaturated HAQs (32), with the 14-Da difference being due to the additional methyl group at the 3 position of the quinoline ring (Fig. 7). The m/z 173 fragment ion of HMNQ, or the corresponding m/z 159 fragment ion of HHQ, is a radical cation and not a cation produced by a rearrangement that would have led to the loss of the nitrogen. This is demonstrated by the fact that when 15 N-anthranilic acid was fed to the bacteria, the m/z 173 ion was increased by 1 Da, thus proving that it still contains one nitrogen atom. The other daughter ion at m/z 212 in the MS/MS spectra of unsaturated HMAQs could also be structurally analogous to the m/z 198 ion observed in unsaturated HAQs. The relatively intense ion at m/z 184, however, does not have an analogous m/z 170 ion in the unsaturated HAQ MS/MS spectra and could arise from the cyclization of the 2' carbon of the side chain with the methyl at the 3 position, followed by a loss of the residual alkyl chain with the formation of a double bond. It is also possible that the same fragmentation pathways involving the 3' carbon of the side chain and leading to an unsaturated six-membered ring could produce that m/z 198 ion. Another possibility is that the m/z 198 and 212

OH

$$R_1 = H, R_2 = C_4H_9$$
: HHQ

 $R_1 = CH_3$, saturated HMAQ

 $R_1 = CH_3$, saturated HMAQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = 172$
 $R_1 = CH_3$, $R_2 = 184$
 $R_1 = CH_3$, unsaturated HMAQ

 $R_1 = CH_3$, unsaturated HMAQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

 $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_{13}$: HMNQ

FIG. 7. Daughter ions observed in the MS/MS spectra of saturated and unsaturated HMAQs and HAQ.

ions in the MS/MS spectra of unsaturated HMAQ ions have their side chains cyclized with the quinoline nitrogen, as proposed for the HAQ MS/MS spectra.

The MS/MS spectra of the saturated HMAQs (family B) present two intense ions at m/z 173 and 186 that are analogous to those of their corresponding saturated HAQs (family D) but with the addition of 14 Da corresponding to the extra methyl on the quinoline ring. These two ions correspond to the quinoline moiety with the 1' and 2' carbons attached to it. We took advantage of this fragmentation pattern to demonstrate that the double bond of the unsaturated HMAQ congeners, as for HMNQ, is indeed between the 2' and 3' carbons. To do so, B. thailandensis and B. ambifaria culture supernatants were hydrogenated using deuterium, and the location of the label in the corresponding saturated compounds was investigated by MS/MS. The daughter ions of the corresponding deuterated pseudomolecular ions at m/z 260, 274, 288, and 302 were observed at m/z 173 and 187 instead of m/z 173 and 186 in the corresponding unlabeled saturated HMAQs. If the double bond had been between the 1' and 2' carbons, both ions would have been labeled. On the other hand, if the double bond had been located further than the 2' position, none of these daughter ions would have been labeled. This proves that the double bond is located between the 2' and 3' carbons for the C₂, C₈, C_9 , and C_{10} members of this family, as we assumed, based on the NMR for the C₀ congener HMNO.

As in *P. aeruginosa*, *B. thailandensis* and *B. pseudomallei* produce another family of HMAQs with their pseudomolecular ions at 16 Da above those of the unsaturated HMAQs (family C). These molecules correspond to HMAQ *N*-oxides,

5348 VIAL ET AL. J. BACTERIOL.

FIG. 8. Putative structures of daughter ions observed in the MS/MS spectra of HMAQ N-oxides.

as they disappeared when supernatants were treated with zinc in acetic acid, conditions known to reduce N-oxides. Their MS/MS spectra produced ions at m/z 172, 173, 184, 186, and 198 (Fig. 8). The m/z 173 ion is probably a radical cation related to the prominent m/z 159 ion observed in the corresponding HMAQ N-oxide through the initial loss of a hydroxyl radical (40). The m/z 172 and 298 daughter ions probably arise from the concerted loss of water, followed by chain cleavage at the positively charged carbon or at the conjugated 3' position. We confirmed the position of the double bond on the 2' carbon by the increase in the intensity of the unsaturated HMAQ congeners upon the reduction of the N-oxide group by zinc. The presence of these N-oxide derivatives in B. thailandensis and B. pseudomallei is consistent with the presence of a gene, which we call hmqL, that is highly homologous to the P. aeruginosa pasL gene, which we found is required for the synthesis of HAQ N-oxides in the latter species (32). Consistently, such a pasL homologue is absent in B. ambifaria, which does not produce the family C HMAQ N-oxides. An Arthrobacter strain from soil was previously reported to produce HMNQ N-oxide, which inhibits various gram-positive bacteria, including multiple-drug-resistant strains of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis (30). This compound was also effective against Helicobacter pylori (52) and was found to be a potent inhibitor of mitochondrial complexes I and III (46), consistent with the well-known activities of HAQ N-oxide derivatives (26, 34, 36).

Another family of compounds that we found at low concentrations in *B. thailandensis* and in *B. ambifaria* cultures are HAQ congeners bearing a double bond at the 2' position (family E). Although unsaturated HAQ congeners were de-

tected previously in P. aeruginosa (32), those produced by B. thailandensis and B. ambifaria have a slightly different retention time, an indication that the position of the double bond is not the same. Upon treatment of the supernatant with deuterium, the MS/MS spectra of the deuterated pseudomolecular ions at m/z 246 and 274 present ions at m/z 159 and 173 instead of the m/z 159 and 172 normally observed with unlabeled HAQ congeners (32), while the MS/MS spectra of the deuterated HAQ congeners bearing the double bond at position 1' show ions at m/z 160 and 174 (32). This proves that the double bond is not at the 1' carbon and is no further than the 2' position, as in family A (unsaturated HMAQs). In B. thailandensis, Diggle et al. (16) reported the detection of only a series of $C_{7:1}$, C_{9:1}, and C_{11:1} and their unsaturated HAQ congeners along with a C₉ congener of 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HQNO). In a recent report (33), we also observed ions with m/z 242, 270, and 292 ions corresponding to HAQ congeners with one unsaturation in B. thailandensis, and based on the report of Diggle et al., we initially assumed that their double bond had to be at the 1' position. However, in view of our current results showing that unsaturated HMAQs have their double bond at the 2' position, we performed MS/MS analysis of the product of deuteration of these unsaturated HAQ congeners. Diggle et al. assigned the position of the double bond based only upon the MS/MS spectrum of these unsaturated HAQ congeners, which could be misleading, as the position of the double bond could shift in the fragmentation mechanism. Catalytic hydrogenation with deuterium is a more reliable method and confirms that the double bond is at the 2' position, like in all the other HMAQs, at least in the B. thailandensis strain that we are studying. The concentration of unsaturated HAQ congeners was close to our limit of detection in B. ambifaria and B. thailandensis, while none were observed in B. pseudomallei cultures.

The main difference between our results and those recently described by Diggle et al. (16) regarding the HAQ derivatives produced by B. pseudomallei and B. thailandensis is that those authors did not report the production of HMAQs. Furthermore, we did not detect any saturated HHQ congener and no saturated C9 N-oxide, and we detected only very small concentrations of the unsaturated HAQ congener that they reported for B. thailandensis. In addition, despite the sensitivity of our method, we did not find HHQ in B. cenocepacia cultures either. It is difficult to compare these last results with those of Diggle et al., as they did not quantify the compounds that they reported. We cannot exclude the possibility that B. thailandensis might produce trace amounts of saturated HAQs (family D) and HAQ N-oxide congeners; their findings could be explained by the fact that while we directly injected culture supernatant samples in our LC/MS assay without preconcentration, Diggle et al. solvent extracted and concentrated their samples 1,000 times prior to analysis (16). The fact that they did not report HMAQs is more surprising, however, since we show here that these methylated derivatives are the prominent ones. We believe that this could be because they focused only on published, known HAQ analogues described previously for P. aeruginosa (32). Moreover, since they studied their Burkholderia strains using a bioreporter designed to detect primarily PQS and HHQ, it is conceivable that it failed to detect HMAQs (21). It is very unlikely that differences in the strains investigated or culture conditions could explain these differences, as these factors have no effect in P. aeruginosa or on our tested strains. Nevertheless, it is clear that in B. ambifaria, B. thailandensis, and B. pseudomallei and under our conditions, HMAQs are more abundant, sometimes by more than 3 orders of magnitude, than unmethylated HAQs. This raises the question of the biological significance of trace amounts of HAQs in these species compared to amounts of HMAQs. In view of the very small amounts of unsaturated HAQ congeners produced by these strains in comparison with those of HMAQs, we named these operons hmqABCDEFG.

Biosynthesis of HMAQs. Because anthranilic acid is the precursor of all HAQs (14), we tested if it is also the common precursor of HMAQs. Adding labeled anthranilic acid to a culture results in the labeling of all the HMAQs. We then found that the inactivation of hmqA in B. thailandensis and in B. ambifaria leads to the abrogation of HMAQ production, as observed for the loss of HAQs from the B. pseudomallei homologue (16) and the pqsA mutant of P. aeruginosa (14). Furthermore, 6-FABA, an analogue of anthranilic acid known to competitively inhibit PqsA (33), also inhibits HMAQ biosynthesis. The fact that this inhibition, as in P. aeruginosa, can also be reversed by an exogenous supply of anthranilic acid indicates that the genetic homology between hmqA and pqsA also translates into a common biological activity. This is in line with the reported complementation of a P. aeruginosa pqsA mutant with a B. pseudomallei homologue (16). The homologies between PqsA and various aryl-CoA ligases indicate that HmqA is likely responsible for the activation of anthranilic acid into a CoA ester (Fig. 1). Such activation of the anthranilic acyl

group would be required for the closing of the second ring of the quinoline core.

In contrast with *P. aeruginosa*, there is no gene responsible for the synthesis of anthranilic acid near the *hmqABCDEFG* operon. Nevertheless, plenty of anthranilic acid seems to be available, as this precursor accumulates in *hmqA* mutant cultures, as we have previously seen in a *pqsA* mutant of *P. aeruginosa* (14). While TrpEG analogues responsible for the biosynthesis of anthranilic acid in the formation of tryptophan are present, part of the anthranilic acid used for HMAQ biosynthesis also comes for tryptophan degradation, presumably through the kynurenine pathway, as shown by our labeled tryptophan experiment.

Within each HMAQ family, the relative amounts of congeners containing an odd number of carbons on their side chains are larger than those with one extra carbon, often by 2 orders of magnitude. This is analogous to the observations made with HAQs and is likely due to the successive addition of acetate groups to form an even-numbered 3-keto fatty acid intermediate, which reacts with anthranilic acid, as first hypothesized by Wells (58) and later confirmed by others (3, 47). Because of the location of the reactive keto group of the 3-keto fatty acid, this produces predominantly an odd-numbered alkyl chain in HAQs and HMAQs. The chain lengths of HMAQs also seem to vary from one Burkholderia species to another, as HMAQs in B. thailandensis and B. pseudomallei are predominantly C₉ congeners, while in B. ambifaria, they are predominantly C₇ congeners.

A difference between Burkholderia and P. aeruginosa is that HMAQs are predominantly unsaturated, while Pseudomonas HAQs are predominantly saturated, and in Burkholderia HMAQs and HAQs, the double bond is at the 2' position, while in unsaturated Pseudomonas HAQs, it is at the 1' position. This probably arises from a difference in the biosynthesis of the 3-keto fatty acid precursor. In P. aeruginosa, it is still unclear if the pqsBCD genes, which all have analogies with 3-keto fatty acid acyl carrier proteins, are responsible for the total synthesis of the 3-keto fatty acid intermediate or if they simply divert some intermediates of general fatty acid biosynthesis into the pathway leading to HAQs. In the Burkholderia strains that we studied, the pqsBCD homologues hmqBCD presumably play the same role in the biosynthesis of the 3-keto fatty acid intermediates (Fig. 1). It remains to be determined if they are responsible for the unsaturation generally encountered in HMAQs or if this occurs because of the difference in the pool of produced fatty acid intermediates between Burkholderia and P. aeruginosa. It is also possible that the hmqBCD genes are responsible for the coupling of the anthraniloyl-CoA and the 3-keto fatty acid and in the closing of the second ring of the quinoline core. An intriguing possibility is that HmqF, which is predicted to contain two acyl-CoA dehydrogenase domains and an attachment site for 3-phosphopantetheine, a functional group present in all ACP proteins, might be responsible for the 2' unsaturation of HMAQs.

The most striking difference between HAQs and HMAQs is obviously the presence of the methyl group at the 3 position. As an *hmqG* mutant stops producing HMAQs and produces HAQ-like molecules instead, HmqG is likely responsible for the addition of the methyl group. Sequence analogies of the *hmqG* product with many SAM-dependent methyltransferases

TABLE 3. Concentrations of the major HMAQs and HAQs produced by wild-type B. ambifaria AMMD and its hmqG mutant

M	lean concn (mg/liter) (S	D) ^a
[M + H] ⁺	B. ambifaria wild type	B. ambifaria hmqG mutant
1.00		
256	15.46 (0.86)	ND
284	8.26 (0.43)	ND
258	0.80 (0.05)	ND
286	1.22 (0.07)	ND
242	0.69 (0.07)	5.16 (0.40)
270	0.39 (0.03)	2.31 (0.20)
244	ND	ND
		0.16 (0.01)
	256 284 258 286	wild type 256

^a Values in parentheses are the standard deviations of data from triplicate assays. ND, not detected.

indicate that SAM is likely to be the source of the methyl group. We initially thought that this methyl group could simply be the product of the reduction of the acid group of the original 3-keto fatty acid intermediate, as this acid group must be removed to produce HHQ in *P. aeruginosa*. However, such an HAQ with a carboxyl function at the 3 position was never detected in *P. aeruginosa* supernatants. The fact that HmqG has homologies with a methyltransferase rather than a decarboxylase could be seen as a confirmation that this acid group is spontaneously lost upon the closing of the second aromatic ring or that another unknown enzyme is responsible for the loss of this acid group in these bacteria. The finding that *hmqG* is coexpressed with the rest of the operon substantiates that HMAOs are indeed the final products of this pathway.

The kinetics of HMAQ production show that these molecules start to accumulate in cultures near the end of the logarithmic growth phase. This is very similar to the HAQ production profile for *P. aeruginosa* (13, 31). In this organism, the *pqsABCDE* operon is controlled by MvfR, whose coinducing ligands are HAQs (61). Thus, it is conceivable that the production of HMAQs is controlled by a regulator induced by HMAQs. Accordingly, we observed that the total level of production of HAQs and HMAQs by the *lumqG* mutant is much lower than that observed in the wild-type strain (26.82 mg/liter total HAQs and HMAQs for the wild type versus 7.63 mg/liter for the *lumqG* mutant) (Table 3), suggesting a regulation of the *lumqABCDEFG* operon by HMAQs.

HMAQs and QS. In *P. aeruginosa*, some of the HAQs act as signaling molecules and are implicated in the regulation of the expression of multiple virulence factors, which includes products of genes controlled by AHL-mediated QS. However, in *P. aeruginosa*, quinolone signaling has no direct effect on the production of AHLs (13). In contrast, we show here that the synthesis of HMAQs is directly implicated in the global QS circuitry by negatively regulating the production of AHLs, at least in *B. ambifaria*. Furthermore, we demonstrate that the

methyl group of HMAQs is crucial for the effect on C₈-HSL production and QS-controlled factors, as the *hmqG* mutant behaves the same as the *hmqA* mutant. How HMAQs influence the production of AHLs is currently under investigation. One possibility is a direct regulation at the level of expression of the AHL synthase. Alternatively, the synthesis of HMAQs might modulate the availability of AHL synthesis precursors or the activity of the AHL synthase. Whether HMAQs play the same role in *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* is still undetermined. However, available data indicate that QS in *B. thailandensis* is much more complex than that in *B. ambifaria*, as it involves multiple LuxIR homologues responsible for the production of numerous AHL signals involved in both positive and negative regulation (54).

Finally, HAQ derivatives may be more widespread than previously thought, raising the intriguing possibility of intergenus communication (18). Still, the methyl group makes the Burkholderia HAQ derivatives distinct from those of P. aeruginosa. Since these new HMAQs appear to be involved in the Burkholderia QS circuitry, and given the essential role of QS in the expression of pathogenic traits in Burkholderia (19, 56), these molecules and the enzymes involved in their biosynthesis could represent attractive targets for the development of novel therapeutics against hmqABCDEFG-carrying pathogenic Burkholderia species.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Canadian Institutes of Health Research operating grant to E.D. and an NSERC research grant to F.L., L.V. and V.D. were recipients of a postdoctoral fellowship and of a Ph.D. scholarship, respectively, from the Fondation Armand-Frappier.

REFERENCES

- Alexeyev, M. F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. BioTechniques 26:824-828.
- Bredenbruch, F., R. Geffers, M. Nimtz, J. Buer, and S. Haussler. 2006. The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. Environ. Microbiol. 8:1318-1329.
- Bredenbruch, F., M. Nimtz, V. Wray, M. Morr, R. Müller, and S. Häussler. 2005. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkyl-quinolines. J. Bacteriol. 187:3630–3635.
- Brett, P. J., D. DeShazer, and D. E. Woods. 1998. Burkholderia thailandensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:317-320.
- Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins, and L. G. Rahme. 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:14613-14618.
- Cheng, A. C., and B. J. Currie. 2005. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev. 18:383-416.
- Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2001. Burkholderia ambifaria sp. nov., a novel member of the Burkholderia cepacia complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1481–1490.
- Coenye, T., and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. Environ. Microbiol. 5:719– 729.
- Coenye, T., P. Vandamme, J. J. LiPuma, J. R. Govan, and E. Mahenthiralingam. 2003. Updated version of the *Burkholderia cepacia* complex experimental strain panel. J. Clin. Microbiol. 41:2797–2798.
- Cornforth, J. W., and A. T. James. 1956. Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. Biochem. J. 63:124-130.
- DeShazer, D., P. J. Brett, R. Carlyon, and D. E. Woods. 1997. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. J. Bacteriol. 179:2116-2125.
- DeShazer, D., D. M. Waag, D. L. Fritz, and D. E. Woods. 2001. Identification of a Burkholderia mallei polysaccharide gene cluster by subtractive hybrid-

- ization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. Microb. Pathog. 30:253-269.
- 13. Déziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lépine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, and L. G. Rahme. 2005. The contribution of MvfR to Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, mlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol. Microbiol. 55:998-1014.
- Déziel, E., F. Lépine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins, and L. G. Rahme. 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alky-lquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:1339–1344.
- Diggle, S. P., P. Cornelis, P. Williams, and M. Camara. 2006. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. Int. J. Med. Microbiol. 296:83-91.
- 16. Diggle, S. P., P. Lumjiaktase, F. Dipilato, K. Winzer, M. Kunakorn, D. A. Barrett, S. R. Chhabra, M. Camara, and P. Williams. 2006. Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen Burkholderia pseudomallei and related bacteria. Chem. Biol. 13: 701-710.
- 17. Diggle, S. P., K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Camara, and P. Williams. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol. Microbiol. 50:29–43.
- Eberl, L. 2006. From a local dialect to a common language. Chem. Biol. 13:803-804.
- Eberl, L. 2006. Quorum sensing in the genus Burkholderia. Int. J. Med. Microbiol. 296:103-110.
- Farrow, J. M., III, and E. C. Pesci. 2007. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. J. Bacteriol. 189:3425–3433.
- Fletcher, M. P., S. P. Diggle, S. A. Crusz, S. R. Chhabra, M. Camara, and P. Williams. 2007. A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. Environ. Microbiol. 9:2683–2693.
- Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184:6472-6480.
- Glass, M. B., A. G. Steigerwalt, J. G. Jordan, P. P. Wilkins, and J. E. Gee. 2006. Burkholderia oklahomensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species formerly known as the Oklahoma strain of Pseudomonas pseudomallei. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2171–2176.
- Hashimoto, M., and K. Hattori. 1967. 2-(2-Heptenyl)-3-methyl-4-quinolinol from a *Pseudomonas*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 15:718-720.
- Hays, E. E., I. C. Wells, P. A. Katzman, C. K. Cain, F. A. Jacobs, S. A. Thayer, E. A. Doisy, W. L. Gaby, E. C. Roberts, R. D. Muir, C. J. Carroll, L. R. Jones, and N. J. Wade. 1945. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 159:725-750.
- Hoffman, L. R., E. Deziel, D. A. D'Argenio, F. Lepine, J. Emerson, S. Mc-Namara, R. L. Gibson, B. W. Ramsey, and S. 1. Miller. 2006. Selection for Staphylococcus aureus small-colony variants due to growth in the presence of Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:19890–19895.
- Homma, Y., Z. Sato, F. Hirayama, K. Komo, H. Shirahama, and T. Suzui. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. Soil Biol. Biochem. 21:723– 728.
- Hooi, D. S., B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, P. Williams, and D. 1. Pritchard.
 2004. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. Infect. Immun. 72:6463-6470.
- Juhas, M., L. Eberl, and B. Tummler. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ. Microbiol. 7:459–471.
- Kamigiri, K., T. Tokunaga, M. Shibazaki, B. Setiawan, R. M. Rantiatmodjo, M. Morioka, and K. Suzuki. 1996. YM-30059, a novel quinolone antibiotic produced by Arthrobacter sp. J. Antibiot. (Tokyo) 49:823–825.
- Lépine, F., E. Déziel, S. Milot, and L. G. Rahme. 2003. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Biochim. Biophys. Acta 1622:36–41.
- Lépine, F., S. Milot, E. Déziel, J. He, and L. G. Rahme. 2004. Electrospray/ mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15:862–869.
- Lesic, B., F. Lépine, E. Déziel, J. Zhang, Q. Zhang, K. Padfield, M. H. Castonguay, S. Milot, S. Stachel, A. A. Tzika, R. G. Tompkins, and L. G. Rahme. 2007. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. PLoS Pathog. 3:1229–1239.
- Lightbown, J. W., and F. L. Jackson. 1956. Inhibition of cytochrome systems
 of heart muscle and certain bacteria by the antagonist of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. Biochem. J. 63:130-137.
- Long, R. A., A. Qureshi, D. J. Faulkner, and F. Azam. 2003. 2-n-Pentyl-4quinolinol produced by a marine Alteromonas sp. and its potential ecological and biogeochemical roles. Appl. Environ. Microbiol. 69:568-576.
- 36. Machan, Z. A., G. W. Taylor, T. L. Pitt, P. J. Cole, and R. Wilson. 1992.

- 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 30:615–623.
- Mahenthiralingam, E., T. Coenye, J. W. Chung, D. P. Speert, J. R. Govan, P. Taylor, and P. Vandamme. 2000. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. 38:910-913.
- McGrath, S., D. S. Wade, and E. C. Pesci. 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudo-monas* quinolone signal (PQS). FEMS Microbiol. Lett. 230:27-34.
- McKnight, S. L., B. H. Iglewski, and E. C. Pesci. 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 182:2702–2708.
- Miao, X.-S., R. E. March, and C. D. Metcalfe. 2003. A tandem mass spectrometric study of the N-oxides, quinoline N-oxide, carbadox, and olaquindox, carried out at high mass accuracy using electrospray ionization. Int. J. Mass Spectrom. 230:123-133.
- Moon, S.-S., P. M. Kang, K. S. Park, and C. H. Kim. 1996. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. Phytochemistry 42:365–368.
- Moon, S.-S., P. M. Kang, K. S. Yoon, S.-J. Yun, and B. B. Park. 1995. Synthesis of plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones metabolites of *Pseudomonas cepacia*. Bull. Korean Chem. Soc. 16:1128–1130.
- Nelson, M. J., S. O. Montgomery, W. R. Mahaffey, and P. H. Pritchard. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. Appl. Environ. Microbiol. 53:949–954.
- 44. Nierman, W. C., D. DeShazer, H. S. Kim, H. Tettelin, K. E. Nelson, T. Feldblyum, R. L. Ulrich, C. M. Ronning, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, T. D. Davidsen, R. T. Deboy, G. Dimitrov, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, H. Khouri, J. F. Kolonay, R. Madupu, Y. Mohammoud, W. C. Nelson, D. Radune, C. M. Romero, S. Sarria, J. Selengut, C. Shamblin, S. A. Sullivan, O. White, Y. Yu, N. Zafar, L. Zhou, and C. M. Fraser. 2004. Structural flexibility in the Burkholderia mallei genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14246–14251.
- Pesci, E. C., J. B. J. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11229–11234.
- Reil, E., G. Hofle, W. Draber, and W. Oettmeier. 1997. Quinolones and their N-oxides as inhibitors of mitochondrial complexes 1 and III. Biochim. Biophys. Acta 1318:291–298.
- Ritter, C., and M. Luckner. 1971. Biosynthesis of 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline derivatives (pseudane) in *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. Biochem. 18:391–400.
- Roitman, J. N., N. E. Mahoney, W. J. Janissiewicz, and M. Benson. 1990. A new chlorinated phenylpyrrole antibiotic produced by the antifungal bacterium *Pseudomonas cepacia*. J. Agric. Food Chem. 38:538–541.
- Royt, P. W., R. V. Honeychuck, V. Ravich, P. Ponnaluri, L. K. Pannell, J. S. Buyer, V. Chandhoke, W. M. Stalick, L. C. DeSesso, S. Donohue, R. Ghei, J. D. Relyea, and R. Ruiz. 2001. 4-hydroxy-2-nonylquinoline: a novel iron chelator isolated from a bacterial cell membrane. Bioorg. Chem. 29:387–397.
- Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160:47-56.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology 1:784-791.
- Taniguchi, M., J. Kazami, and K. Tanaka. May 2000. Preparation of quinolones as anti-Helicobacter pylori. Japan patent JP2000143632 A 20000526.
- 53. Trân Van, V., O. Berge, S. N. Ke, J. Balandreau, and T. Heulin. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia* vietnamiensis on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. Plant Soil 218:273-284.
- Ulrich, R. L., H. B. Hines, N. Parthasarathy, and J. A. Jeddeloh. 2004.
 Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. J. Bacteriol. 186:4350–4360.
- Vandamme, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and J. R. Govan. 2003. Burkholderia cenocepacia sp. nov.—a new twist to an old story. Res. Microbiol. 154:91-96.
- Vial, L., M. C. Groleau, V. Dekimpe, and E. Déziel. 2007. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J. Microbiol. Biotechnol. 17:1407–1429.
- Wade, D. S., M. W. Calfee, E. R. Rocha, E. A. Ling, E. Engstrom, J. P. Coleman, and E. C. Pesci. 2005. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 187:4372-4380.
- Wells, I. C. 1952. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aerugi-nosa*. Synthesis of Pyo 1b. Pyo 1c, and Pyo 111. J. Biol. Chem. 196:331–340.
- Williams, P., K. Winzer, W. C. Chan, and M. Camara. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 362:1119-1134.
- Wopperer, J., S. T. Cardona, B. Huber, C. A. Jacobi, M. A. Valvano, and L. Eberl. 2006. A quorum-quenching approach to investigate the conservation

5352 VIAL ET AL. J. BACTERIOL.

- of quorum-sensing-regulated functions within the Burkholderia cepacia complex. Appl. Environ. Microbiol. 72:1579-1587.

 61. Xiao, G., E. Déziel, J. He, F. Lépine, B. Lesic, M. H. Castonguay, S. Milot, A. P. Tampakaki, S. E. Stachel, and L. G. Rahme. 2006. MvfR, a key Pseudomonas aeruginosa pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. Mol. Microbiol. 62:1689-1699.
- Xiao, G., J. He, and L. G. Rahme. 2006. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvJR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. Microbiology 152:1679-1686.
 Zhou, H., F. Yao, D. P. Roberts, and T. G. Lessie. 2003. AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. Curr. Microbiol. 47:174-179.

Vial, L., Groleau, M. C., <u>Dekimpe, V.</u> & Deziel, E. (2007). *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol* 17, 1407-1429.

Contribution: Rédaction de la section liée au QS et aux molécules-signal de Burkholderia.



Burkholderia Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular **Products**

VIAL, LUDOVIC, MARIE-CHRISTINE GROLEAU, VALÉRIE DEKIMPE, AND ERIC DÉZIEL*

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received: July 1, 2007 Accepted: July 31, 2007

Abstract The Burkholderia genus consists of over 40 Gram-negative, β-proteobacteria species that occupy remarkably diverse ecological niches. This genus contains species pathogenic to human, animals, and plants, as well as species involved in promoting plant growth and biodegradation of pollutants. This is largely explained by the extraordinary versatility of Burkholderia, as reflected by the remarkable diversity of extracellular products released by these bacteria. We exhaustively surveyed the extracellular enzymes, siderophores, toxins, antimicrobials, and other secondary metabolites produced by the members of this very diverse genus. Available information on regulation, especially quorum sensing mechanisms, and secretion is highlighted.

Keywords: Burkholderia, enzymes, siderophores, toxins, antimicrobials, quorum sensing

The Burkholderia genus, β subdivision of the proteobacteria, comprises more than 40 species that inhabit remarkably diverse ecological niches, as they have been isolated from soil, plant rhizosphere, water, insects, fungus, and hospital environments and from infected humans (Table 1). The genus Burkholderia was proposed by Yabuuchi et al. [218] to accommodate the former rRNA group II pseudomonads [218]. In fact, confusion with Pseudomonas has impeded knowledge progression.

Traditionally, Burkholderia species have been known as plant pathogens. B. cepacia was first described by Burkholder in 1950 as a plant pathogen causing sour skin of onion [22]. For example, B. glumae causes rot of rice grains and seedlings (panicle blight) [88]. Several Burkholderia species have developed beneficial interactions with their plant hosts. Somes species are able to fix atmospheric nitrogen, including B. vietnamiensis, B. unamae, and B. tropica [23, 157, 188]. Legumes are also

nodulated by several Burkholderia species such as B. mimosarum, B. nodosa, and B. phymatum [28, 29, 154]. Several Burkholderia species have considerable commercial and ecological importance. Certain species of Burkholderia have proved to be very efficient in biocontrol, bioremediation, and plant growth promotion. For example, B. xenovorans strain LB400 is one of the most effective polychlorinated biphenyl (PCB) degraders known [27].

In contrast, several Burkholderia species are also opportunistic human pathogens. These species include all Burkholderia cepacia complex (Bcc) bacteria, B. gladioli, and B. fungorum. The Bcc contains (at least) nine closely related species or genomovars, which can cause severe respiratory infections in people suffering from cystic fibrosis (CF) or chronic granulomatous disease [39]. All nine species have been recovered from CF patients, but B. cenocepacia and B. multivorans are the dominant Bcc species [119]. B. cenocepacia comprises the most virulent clones and has been associated with higher mortality rates among CF patients [119].

B. pseudomallei and B. mallei are the only known members of the genus Burkholderia that are primary pathogens in humans and animals. The saprophyte B. pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a potentially fatal septicemic infection of animals and humans [30]. Melioidosis is endemic in tropical and subtropical areas of Southeast Asia and Northern Australia [30]. B. pseudomallei has been classified as a potential biological weapon and has been used by Germany during World War I [160]. B. mallei is the etiologic agent of glanders, which is mainly a horse disease but in rare cases affects humans [138]. B. thailandensis is closely related to B. pseudomallei and is generally considered avirulent [68].

The ecological versatility of Burkholderia is likely due to their large genomes, which are often comprised of several large replicons (two to four circular chromosomes or large plasmids). An important variation in genome size from 4.7 to 9 Mb is observed in the Burkholderia genus

*Corresponding author Phone: 450-687-5010; Fax: 450-686-5501;

E-mail: eric.deziel@iaf.inrs.ca

Table 1. List of known Burkholderia species, with their reported QS systems.

Burkholderia species	Habitat	Reference	Quorum sensing	Alternate name		
name	панка	Reference	Proteins	Signaling molecules	Allemate name	
Complex cepacia (Bcc)						
B. cepacia genomovar I	Humans (CF and non- CF), animals, soil, rhizosphere, plants	[218]	CepIR [117]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	Pseudomonas cepacia	
B. multivorans genomovar II	Humans (CF and non- CF), soil, hospital environment	[200]	CepIR [117]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL		
B. cenocepacia genomovar III	Humans (CF and non- CF), animals, soil, rhizosphere, plants	[200]	CepIR [117]CciIR [11,120]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	Burkholderia cepacia, Pseudomonas cepacia	
3. stabilis genomovar IV	Humans (CF and non- CF), hospital environment	[201]	CepIR [41,117]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	сериси	
B. vietnamiensis genomovar V	Humans (CF and non- CF), animals, soil, rhizosphere, plants	[66]	CepIR, BviIR	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL		
B. dolosa genomovar VI	Humans (CF), rhizosphere	[205]	NI	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL		
8. ambifaria genomovar VII	Humans (CF), soil, rhizosphere	[38]	BafIR [229]	C ₈ -HSL		
B. anthina genomovar VIII	Humans (CF), animals, water, soil, rhizosphere	[203]	NI	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL		
B. pyrrocinia genomovar X	Humans (CF and non- CF), soil, rhizosphere, plants	[203]	NI	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	Pseudomonas pyrrocinia	
B. andropogonis	Plants	[66]	NI	NI	Pseudomonas andropogonis	
			NI	NI	Pseudomonas woodsii	
B. caledonica	Rhizosphere	[37]	NI	NI		
B. caribensis	Soil, root nodules	[2]	NI	NI		
3. caryophylli	Plants	[218]	NI	NI	Pseudomonas caryophylli	
8. ferrariae	Mines	[199]	NI	NI		
3. fungorum	Humans (CF and non- CF), animals, fungus, soil, plants, water	[37]	NI	NI		
3. ginsengisoli	Soil	[92]	NI	NI		
B. gladioli	Humans (CF and non- CF), plants	[218]	NI	NI	Burkholderia cocovenenans, Pseudomonas antimicrobica	
3. glathei	Plants, rhizosphere	[200]	NI	NI	Pseudomonas glathei	
3. glumae	Humans (non-CF), plants	[197]	TofIR [51]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	Pseudomonas glumae	
3. graminis	Plants, soil, rhizosphere	[206]	NI	NI		
3. hospita	Soil	[72]	NI	NI		
3. kururiensis	Water, industrial contaminant	[227]	NI	NI		
B. mallei	Horses, mules, donkeys, humans	[218]	BmaIR 1 and 3 [193]	C ₈ -HSL, 3-hydroxy- C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3-hydroxy-C ₁₀ -HSL	Pseudomonas mallei	
3. mimosarum	Root nodules	[28]	NI	NI		

Table 1. Continued.

Burkholderia species name	Habitat	Reference	Quorum sens		
			Proteins	Signaling molecules	 Alternate name
B. nodosa	Root nodules	[29]	NI	NI	
B. oklahomensis	Human (non-CF)	[69]	NI	NI	Oklahoma strain of Pseudomonas
B. phenazinium	Plant, soil	[206]	NI	NI	pseudomallei Pseudomonas
B. phenoliruptrix	Soil	[40]	NI	NI	phenozinium
B. phymatum	Root nodule	[202]	NI	NI	
B. phytofirmans	Rhizosphere, soil	[163]	NI	3-Hydroxy-C ₈ -HSL	
B. plantarii	Plants	[197]	PlaJR [173]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	Burkholderia gladioli Pseudomonas plantarii
B. pseudomallei	Humans, animals, soil, water	[218]	BpsIR [174], PmiIR, BpmIR2 and 3 [192,198]	C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3-hydroxy-C ₈ -HSL, 3-hydroxy-C ₁₀ -HSL, 3-hydroxy-C ₁₂ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₄ -HSL	Pseudomonas pseudomallei
B. sacchari	Soil	[19]	NI	NI	
B. silvatlantica	Rhizosphere, plants (roots, leaves)	[149]	NI	NI	
B. soli	Soil	[224]	NI	NI	
3. sordidicola	Fungus	[111]	NI	NI	
3. terrae	Soil	[220]	NI	NI	
3. terricola	Soil	[72]	NI	NI	
3. thailandensis	Soil	[20]	BtalR1 to 3 [194]	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL	Burkholderia pseudomallei-like
3. tropica	Plants (roots, stem), rhizosphere	[157]	NI	NI	species
. tuberum	Root nodule	[202]	NI	NI	
. ubonensis	Humans (non-CF)	[218]	NI	NI NI	
. unamae	Plants (roots, stem), rhizosphere	[23]	NI	NI	
. xenovorans	Humans (CF and non- CF), soil, rhizosphere	[72]	BxeB0608, BxeB0610, suggested to be CciIR- related [27,120]	NI	

[215]. The presence of multiple insertion sequences that confer genome plasticity could also explain the versatility of the genus Burkholderia [130].

Burkholderia species secrete a variety of extracellular enzymes with proteolytic, lipolytic, and hemolytic activities. Several strains secrete also toxins, antibiotics, and siderophores. The extracellular products of Burkholderia represent admirably the diversity and versatility of that genus. In this review, we present a survey of the extracellular products of Burkholderia species and their role in interaction with their hosts. Regulation and secretion of these products are also reported.

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF EXOPRODUCTS: QUORUM SENSING

Bacteria closely regulate the synthesis and release of extracellular products. Besides environmental and physiological conditions that influence expression of exoproducts, another type of global regulation is widespread among bacterial populations and is called quorum sensing (QS) [156]. Quorum sensing is fundamental to the ability of many bacterial species to create coordinated cell-to-cell interactions. Quorum sensing is a cell-to-cell communication system used by bacteria to perceive and respond to their population

density in order to coordinate gene expression. In Gramnegative bacteria, the most widespread QS mechanism is based on LuxR-type transcriptional regulators and their cognate *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) ligands [63]. These molecules, when they reach a threshold reflecting cell density, activate LuxR-type transcriptional regulators that specifically regulate bacterial gene expression.

Quorum sensing has been well studied among Bcc bacteria, where it was first identified from the clinical isolate *B. cenocepacia* strain K56-2 [108], and comprises the LuxIR-type homologs CepI and CepR (Table 1). The CepI synthase is responsible for the production of two AHLs: *N*-hexanoyl-HSL (C₆-HSL) and the most abundant *N*-octanoyl-HSL (C₈-HSL). The transcriptional regulator CepR responds most efficiently to C₈-HSL [82]. The *cepI* and *cepR* genes have been found in the 9 species comprised in the Bcc [117]. In *B. ambifaria*, the CepIR system has been renamed BafIR [229].

Some Bcc species possess more than one QS circuitry. For example, some B. vietnamiensis strains, as well as

producing C_6 - and C_8 -HSLs, display additional AHLs, C_{10} -HSL being the most abundant [41]. In these strains, another QS system is responsible for the production of these additional AHLs, named BviIR. BviI and BviR are only 36% identical to CepI and CepR, respectively. Whether the BviI/BviR system interacts with the CepI/CepR system remains to be investigated. In a particulary virulent strain of *B. cenocepacia* lineage ET12, another QS system is also present and is encoded in a pathogenicity island [11]. It is yet unclear whether this QS system, consisting of the AHL synthase CciI and its cognate receptor protein CciR, operates independently of CepI/CepR.

Although QS has been less studied outside the Bcc, it appears present in every *Burkholderia* strain where it was investigated. In *B. glumae* and *B. plantarii*, QS systems have been identified and named TofIR [93] and PlaIR [173], respectively. These two systems share more than 99% identity, and 75% identity with the CepIR system [173].

Table 2. Extracellular enzymes.

Class	Gene	Regulation	Species	Secretion
Proteases	zmpA	CepIR [67,172]	B. cepacia B. cenocepacia B. stabilis B. ambifaria B. pyrrocinia	Type II secretion pathway [83]
	zmpB	CciIR and CepIR [98,120]	B. cepacia B. cenocepacia B. stabilis B. ambifaria B. pyrrocinia	Type II secretion pathway [79,83]
	mprA	PmiIR [198]	B. pseudomallei	Type II and IV secretion pathways [79]
	ND	Not QS-regulated [194]	B. thailandensis	ND
Lipases	lipA	ND	B. cepacia B. glumae	Sec machinery, translocation <i>via</i> a chaperone [62,79]
	ND	Not QS-regulated [174,192]	B. pseudomallei	Type II secretion pathway [50,59]
	ND	BtaIR 1 to 5 [194]	B. thailandensis	ND
	ND	CepIR [108,126]	B. cepacia B. cenocepacia	Type II secretion pathway [158]
Chitinases	ND	Cep1R [5,82,108,109]	B. cepacia B. cenocepacia	ND
	ND	ND	B. gladioli	Type II secretion pathway [33]
Collagenase	ND	ND	B. pseudomallei	Type II secretion pathway [50]
Poly galacturonase	pehA	CepIR [5]	B. cepacia B. caryophylli B. gladioli	ND
Phospholipases C	ND	Not QS-regulated [194]	B. thailandensis	ND
P	ND	ND	B. vietnamiensis	Type 11 secretion pathway [59]
	PLC-N	Phosphate and BviIR [212]	B. cepacia	ND
	ND	BpsIR [174]	B. pseudomallei	ND
	ND	ND	B. ambifaria B. multivorans B. cenocepacia	ND
	PCL1 and	12 Not QS-regulated [192]	B. pseudomallei	Type II and IV secretion pathways [50]

Quorum sensing in the pathogens *B. pseudomallei* and *B. mallei* is more complex than in other *Burkholderia* species. Cell-to-cell communication networks in these organisms comprise multiple LuxIR homologs utilizing numerous AHL signal molecules. In various *B. pseudomallei* strains, four LuxI and six LuxR homologs were identified [174, 192, 198]. In *B. mallei*, the QS circuitry consists of two LuxIR-like homologs, but in contrast with *B. pseudomallei*, lacks the BpmIR2, which shares the highest degree of homology with the BviIR system of *B. vietnamiensis* [193].

Although little is known about the regulation of extracellular molecules such as antibiotics and toxins produced by *Burkholderia* spp., multiple extracellular enzymes have been shown to be under the control of QS. In addition, a secretory machinery is needed to export many high molecular weight exoproducts in the extracellular environment. However, only a few studies have focused on their secretion pathways in the *Burkholderia* genus. Regulation and secretion of each category presented here are reported in the different tables within this review.

EXTRACELLULAR ENZYMES

The severity of infections by Bcc strains may be related to their ability to secrete a huge diversity of extracellular proteins. Production of enzymes by environmental strains can also be interesting for industrial purposes. The large variety of enzymes secreted by the *Burkholderia* correlates with the diversity of their ecological niches (Table 2).

Proteases

A majority of Bcc isolates produce extracellular proteases. In a study on exoenzymes production in CF isolates of B. cenocepacia, B. multivorans, B. ambifaria, and B. vietnamiensis, only B. ambifaria and B. cenocepacia had proteolytic activity on BHI-milk agar [26]. A 34 kDa protease formerly named PSCP (Pseudomonas cepacia protease) was purified from B. cenocepacia strain Pc715j supernatant [127]. This protease, now known as ZmpA, is a zinc metalloprotease. Expression of zmpA was detected in B. cepacia, B. cenocepacia, B. stabilis, B. ambifaria, and B. pyrrocinia, which correlated with a strong protease activity when tested on BHI-milk agar. Strains in which the zmpA gene was absent (B. multivorans, B. vietnamiensis, B. dolosa, and B. anthina) showed no proteolytic activity. B. cepacia genomovar I type strain ATCC 25416, an onion pathogen, shows proteolytic activity and expresses ZmpA [4,67]. ZmpA is important for extracellular protease activity in Bcc strains [67]. The mature ZmpA is proteolytically active against hide powder azure, type IV collagen, fibronectin, neutrophil alpha-1 proteinase inhibitor, alpha(2)-macroglobulin, and gamma interferon [97]. The impact of ZmpA on persistence was investigated. A zmpA- mutant of B. cenocepacia K562 was less able to persist in the lungs of infected rats [42]. However, in *B. cenocepacia* Pc715j, the same mutation caused no difference in persistence when compared with the parent strain [42]. Quorum sensing *cepl-* and *cepR*-mutants of this strain showed less proteolytic activity than the parent strain [4]. ZmpA expression also seems to be controlled by the CepIR QS system in *B. cenocepacia* K56-2 and, accordingly, a possible Cep box is found in the promoter region [181].

A second metalloprotease called ZmpB was identified in the same species carrying ZmpA. ZmpB has proteolytic activity against α -1 proteinase inhibitor, α_2 -macrogobulin, type IV collagen, fibronectin, lactoferrin, transferrin, and immunoglobulins [98]. $zmpB^-$ mutants and $zmpA^-zmpB^-$ double mutants show no proteolytic activity against casein and are less virulent in the agar bead rat lung infection model, indicating that proteolytic activity is involved in virulence of the bacteria. zmpB expression is controlled by CepIR and CciIR quorum sensing systems in *B. cenocepacia* [98].

Most *B. pseudomallei* isolates show protease activity on BHI-milk agar [9, 50]. Strains deficient in protease production are less virulent than the parental strain in diabetes-induced Sprague-Dawley rats, a lung infection model [164]. However, Gauthier *et al.* [64] reported no correlation between virulence and proteolytic activity when human isolated *B. pseudomallei* ATCC 23353 was injected intraperitoneally in SWISS mice, although this strain is a low protease producer [64, 107]. In addition, a deficiency in the type II secretion pathway inhibits protease activity but does not affect virulence of a *B. pseudomallei* mutant in Syrian hamsters, which are usually very susceptible to *B. pseudomallei* infections [50].

The *mprA* gene, encoding a metalloprotease expressed by *B. pseudomallei*, was cloned and sequenced [107]. An *mprA* mutant has very low protease activity compared with wild type, indicating production of MprA is essential to *B. pseudomallei*'s proteolytic activity [198]. The SWISS mice were used to test the *mprA* mutant's virulence compared with parental strain *B. pseudomallei* 008. No significant differences were noted, indicating that MprA did not act as a virulence determinant in this model. [198]. The PmIIR QS system downregulates expression of MprA during the stationary phase in *B. pseudomallei* [198]. *B. thailandensis*, although closely related to *B. pseudomallei*, does not seem to regulate its proteolytic activity by QS, as shown by Ulrich *et al.* [194].

Lipases

Many bacterial species produce lipases, enzymes that catalyze the hydrolysis and synthesis of esters of glycerol with long-chain fatty acids. Lipases of microbial origin have found great application in many industrial sectors since they are able to catalyze a large variety of reactions.

Ten B. cepacia (originally P. cepacia) isolates from the sputum of CF patients were tested for their lipolytic

activity against various substrates. All of them produced variable activities when substrates of different chain lengths were used [113]. A similar screening was performed on various Bcc CF isolates of *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, *B. vietnamiensis*, and *B. multivorans*. All the strains were lipolytic against various substrates, although the activity from *B. multivorans* was the strongest [26].

A 25-kDa lipase has been purified by gel filtration from the clinical isolate B. cepacia 90ee supernatant and tested on the lungs of rats [114], resulting in a large amount of proteinaceous exudates, accumulation of polymorphonuclear leucocytes and red blood cells, and disorganization of the alveolar structure [114]. B. cepacia DSM3959 produces an extracellular lipase, LipA [89], whose activity depends on the presence of the chaperone, LimA [1, 79]. An extracellular 37-kDa cholesterol esterase was purified from B. cepacia strain ST-200, which shows 87% similarity to LipA from B. cepacia DSM3959 and preferentially hydrolyzes long-chain fatty acid esters of cholesterol, except cholesteryl palmitate. This enzyme also displays lipolytic activity toward various p-nitrophenyl esters [184]. B. glumae strain PG1, a rice pathogen, also produces a LipA lipase [60, 158]. The chaperone LipB is essential for folding of the LipA precursor into an active enzyme and acts on LipA stability by protecting it against proteolysis [55, 61, 62]. the presence of hexadecane and Tween 80 in the medium was shown to enhance LipA production and activity, depending on the carbon source [18].

In *B. pseudomallei*, lipase activity was detected in 96% of strains investigated for their extracellular production [9]. Quorum sensing seems not to control lipase production in this bacterium [192]. However, in *B. thailandensis*, which is genetically closely related to *B. pseudomallei*, lipase production is positively regulated by LuxIR homolog BtaIR2 and negatively regulated by BtaIR1 and BtaIR3. Mutations in *luxR* homologs *btaR4* and *btaR5* increase lipase production when compared with the wild-type strain [194]. A study on Tn5 mutants of *B. pseudomallei* showed that *gspC*, a centrally located gene of a genetic locus implicated in secretion, is essential for exoproduction of protease, lipase, and phospholipase C, suggesting this bacterium secretes these products by the same pathway [50].

Chitinases

Chitin is a homopolymer of N-acetyl-p-glucosamine (GlcNAc) residues linked by β -1,4 bonds, found in the exoskeletons of arthropods, coelenterates, nematodes, protozoa, and molluses and in the cell walls of many fungi [222]. Chitosan is a deacetylated derivative of chitin. Low-molecular-weight chitosan oligomers are studied for their beneficial biological activities such as their antifungal and antibacterial potentials. Chitinases are able to hydrolyze the 1,4-beta-linkages of chitin [151, 222].

B. cepacia KH2, a strain isolated from the bed log of Shiitake mushrooms, secretes a 34-kDa chitinase. This

enzyme exhibits higher activity against 62% deacetylated chitosan (Chitosan 7B) and colloidal chitin than toward highly deacetylated chitosan substrates such as Chitosan EL, 10, 9B, and 8B [139]. B. gladioli can be found in many CF patients' lungs [34, 216] or in some chronic granulomatous disease (CGD) cases [159], but is primarily known as a plant pathogen responsible for infection of Gladioli [125]. Two chitosanases (I and II), which have respectively 37 and 30 kDa, were purified from B. gladioli CHB101 cultures [165]. Most bacterial chitosanases are induced by the presence of chitosan in the medium, although these two enzymes are produced in a constitutive manner. They are responsible for 90% of the chitolytic activity in the medium when chitosan (D.A. 30%) is used as a substrate. More recently, a third chitosanase (chitosanase A) with a molecular mass of 28 kDa and strong activity against chitosans with a low degree of acetylation (D.A. between 0 and 30%) was purified from the same strain. However, it has no activity against colloidal chitin and carboxymethyl cellulose [166]. Chitosanase A can fully hydrolyze chitosan (D.A. 0%), chitopentaose, and chitohexaose, whereas chitosanases I and II cannot. Chitosanase A seems to be responsible for the degradation and utilization of GlnN oligomers produced by the action of chitosanases I and II on partially acetylated chitosan [166]. Chitinase activity is also detected in B. cenocepacia H111 supernatant, and it seems to be regulated by the QS CepIR system [83, 181].

Collagenase

When comparing the secretomes from genetically closely related *B. thailandensis* and *B. pseudomallei*, a 65-kDa protein was identified as being a collagenase. Its absence in the *B. thailandensis* profile was suggested to contribute to the virulence of *B. pseudomallei* [153].

Polygalacturonase

Pectic substances are found in the cell walls of plants. Plant pathogens secrete a variety of cell wall-degrading enzymes responsible for the breakdown of polysaccharides that compose cell walls, which helps them invade plant tissues [123, 210]. Polygalacturonase are pectin-degrading enzymes. B. cepacia gen. I-induced maceration of the onion is possibly related to polygalacturonase secretion, which is known to be implicated in onion disease development [4, 71]. Polygalacturonase activity was detected in B. cepacia ATCC 25416 supernatant in the presence of polygalacturonic acid [71, 123]. A cepIR mutant shows diminished production of polygalacturonase, and this correlates with attenuated maceration of onion [4]. Polygalacturonase production was also found in B. gladioli and B. caryophylli [71].

Phospholipase C

Phospholipases of the C type (PLC) are enzymes that cleave the phosphodiester bond of phospholipids to yield

diacylglycerol and a water-soluble phosphate ester. PLC are present in both Gram-positive and Gram-negative bacteria [175]. Two types of PLC can be distinguished: hemolytic and nonhemolytic. For example, in P. aeruginosa, the hemolytic PLC lyzes red blood cells, hydrolyzing phosphatidylcholine and sphingomyelin. The nonhemolytic PLC hydrolyzes phosphatidylcholine and phosphatidylserine, but not sphingomyelin [142]. PLC might be important for interaction with the phospholipids of eukaryotic cell membranes during infections [175].

B. cenocepacia, B. multivorans, B. ambifaria, and B. vietnamiensis isolates from CF patients produce PLC [26]. A 54-kDa nonhemolytic PLC was purified from B. cepacia strain Pc224c [213]. Expression of this PLC was repressed by high phosphate concentrations [212]. Two nonhemolytic PLC (Plc1 and Plc2) have been characterized in B. pseudomallei K96243. These PLC are able to hydrolyze phospholipid phosphatidylcholine and sphingomyelin [100]. Plc1, together with Plc2, contributes to the plaque formation assay used to detect cell-to-cell spread. B. pseudomallei K96243 requires Plc2 for cell cytotoxicity, but not Plc1 [100]. They have no effect on induction of apoptosis [100]. These two PLC present on chromosome 1 share strong homology with the two PLC from B. thailandensis [99, 100]. Only a gene homologous to plc1 is present in the B. mallei genome [100]. The published B. pseudomallei K96243 genome sequence reveals a third PLC on chromosome 2 (Plc3) [80,100]. In B. pseudomallei 1026B, this PLC is involved in virulence in the hamster model of acute melioidosis, as pcl3 is strongly upregulated in several infected hamster organs [191]. Quorum sensing mutants of B. pseudomallei 1026B are not altered in PLC production [192]. However, PLC production by B. pseudomallei KHW is dependent on the growth phase and is positively regulated by the BpsIR QS system [174]. On the other hand, disruption of the B. thailandensis QS system had no effect on PLC activity [194].

There are few reports on the hemolytic PLC activity in Burkholderia. Two genes (with one gene that shares homology with PLC from P. aeruginosa) from B. cepacia

PC-69 are required for expression of hemolytic and PLC activities (when only one gene is expressed, hemolytic and PLC activities are not detected) [204]. The phospholipase activity of B. cepacia does not correlate with hemolytic activity. Nagazawa et al. [137] reported that 70% of B. cepacia strains produce lecithinase but only 4% produce hemolysin.

HEMOLYTIC ACTIVITY

Hemolytic activity is very often found in Burkholderia [15, 26]. Bevivino et al. [15] reported that several strains belonging to the Bcc exhibit hemolytic activity, B. ambifaria and B. pyrrocinia being the species with the highest percentage of strains positive for this activity [15]. Surprisingly, in that study, a much higher percentage of environmental than clinical isolates showed hemolytic activity [15]. Hemolytic activity is also reported in B. pseudomallei, but B. mallei and B. thailandensis are normally negative (see Rhamnolipids section) [9]. B. cenocepacia J2315 secretes a lipopeptide with a hemolytic activity against horse and human erythrocytes [84]. At low concentration, this toxin is able to induce apoptosis in human neutrophils. At high concentration, this toxin induces degranulation of mammalian phagocytes [84].

SIDEROPHORES

Iron is one of the most abundant element on Earth and one of the most important nutrients of bacteria. However, in the presence of oxygen and at neutral pH, Fe2+ is rapidly oxidized to Fe3+, which is not readily available to bacteria. Bacteria have developed ways to scavenge iron with high affinity by producing siderophores, low-molecular-weight chelating molecules that sequester iron from other ironcontaining molecules present in the surroundings. For example, in animal hosts, little free iron is available to bacteria as it is bound by lactoferrin, transferrin, and heme

Table 3. Siderophores.

Class	Gene	Regulation	Species	Secretion
Salicylic acid Pyochelin	ND pch	Iron [207]	B. cenocepacia	Efflux pump [136]
Ornibactin		Not QS-regulated [109]	Bcc	ND
Offiloacun	pvd	CepIR [5,82,108,109], Fur [3]	B. cenocepacia B. cepacia B. ambifaria B. vietnamiensis	ABC transporter OrbE [3]
Malleobactin	mbaA, mbaF	Fur (iron) [115]	B. pseudomallei	ND
Cepabactin	ND	ND	Bcc	ND
Cepaciachelin	ND	ND	B. ambifaria	ND

ND: Not determined.

[211]. Members of the *Burkholderia* genus produce many kinds of siderophores which, depending on the chemical structure of their chelating group, are mostly classified into hydroxamates (based on hydroxamic acid) and catecholates (containing a catechol ring) [155, 186] (Table 3).

Salicylic Acid

Salicylic acid, or 2-hydroxybenzoic acid, which serves as a precursor for many siderophores such as pyochelin, was initially identified in many B. cepacia isolates and was then called azurechelin [170]. It has iron-binding properties and appears to promote iron uptake as well as growth of many bacteria in iron-limiting conditions, including B. cenocepacia [171]. Its production is regulated by the availability of iron [170]. In B. cenocepacia, salicylate was found to induce an antibiotic efflux pump, conferring resistance to chloramphenicol, trimethoprim, and ciprofloxacin [136]. Since very low iron is present in CF lungs, it was proposed that salicylate might induce efflux-mediated resistance, even in the absence of antibiotic selective pressure, and then contribute to the virulence of this bacterium [136]. The role of salicylate as a siderophore is often questioned. Bacteria that produce salicylate but no other siderophore are negative in the standard CAS plate assay, even when it is overproduced or when a shuttle between the dye complex and the siderophore is added [171]. Moreover, mutants producing salicylate as the sole potential siderophore are growth limited under ironrestrictive conditions [3, 49].

Pyochelin

The siderophore pyochelin was first described in studies on *P. aeruginosa* grown under iron-limiting conditions [46]. It is derived from the condensation of two molecules of cysteine with salicylic acid, which requires the presence of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), PchE and PchF. PchE is necessary for the synthesis of the first intermediate, and PchF is responsible for synthesis of the core structure. These two enzymes are coded by the *pchEFGHI* operon, which is regulated by iron-regulated repressor Fur and by PchR, an AraC family transcriptional regulator [77, 116]. Details on the biosynthesis and regulation of pyochelin have been recently reviewed [186].

Pyochelin is produced by some members of the Bcc, including *B. cepacia* strains (*e.g.*, ATCC 25416 and ATCC 17759) [129]. However, in a study screening Bcc clinical isolates, about 50% produced little or no pyochelin [47, 169]. Strain K56-2, now confirmed to be *B. cenocepacia*, produces negligible amounts of pyochelin, whereas the clinical isolate Pc715j produces significant amounts [209]. The *pch* genes coding for the biosynthesis machinery and transport of pyochelin are found in both *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*, but not in *B. mallei* [138]. *B. cenocepacia* Tn5 mutants were screened for the inability to

produce pyochelin. Two mutants were identified. In both mutants, the transposon had integrated into the *cysW* gene coding for a component of the sulfate/thiosulfate transporter. Both mutants were also defective in sulfate transport, and the ability to produce pyochelin was restored in the presence of cysteine, a bioprecursor of pyochelin [58].

Ornibactin

Ornibactin is a linear hydroxamate-hydroxycarboxylate siderophore, related in its peptide structure to pyoverdine, which is produced by P. aeruginosa and P. fluorescens [129, 176]. It is composed of a conserved tetrapeptide, L- $Orn^{1}(N^{\delta}-OH,N^{\delta}-acyl)-D-threo-Asp(\beta-OH)-L-Ser-L-Orn^{4}(N^{\delta}-acyl)$ OH, N^{δ} -formyl)-1,4-diaminobutane and it provides three bidentate metal chelation groups. These three groups (two hydroxamates and one α-hydroxycarboxylate) are obtained by modification of the side chains of the N- and C-terminal ornithines, and the D-aspartate found in the peptide. Depending on the chain length of the acid binding to Orn¹, three species of ornibactin are generated: ornibactin-C4, ornibactin-C₆, and ornibactin-C₈ [176]. During a study on clinical Bcc strains, ornibactin was shown to be produced by 87% of tested isolates [47]. It has been isolated from culture supernatants of B. vietnamiensis and was also identified in B. ambifaria PHP7, in two clinical strains of B. cepacia (ATCC 17759 and ATCC 25416), and in many other Bcc strains including B. cenocepacia [12, 129]. Ornibactin appears to be the most prevalent siderophore among the Burkholderia. The genes required for ornibactin biosynthesis and transport have been identified in B. cenocepacia K56-2 and shown to be negatively regulated by the QS system CepIR, in contrast to pyochelin and salicylic acid [109, 171]. In a proposed synthesis pathway model, precursors are modified by the products of pvdA, pvdF, orbG, orbK, and orbL genes and assembled into ornibactin by NRPSs OrbI and OrbJ. PvdA encodes for Lornithine N⁵-oxygenase, an enzyme responsible for catalyzing the hydroxylation of the δ -amino group nitrogen of ornithine, the first step in the formation of a hydroxamate siderophore [208]. B. cenocepacia K56-2 pvdA mutants display no siderophore activity, but can be restored by addition of the precursor L-N⁵-OH-Orn. The pvdA⁻ mutants are less virulent than the parent strain in chronic and acute models of respiratory infection in rats [171]. Details about the biosynthesis and transport of ornibactin across the cytoplasmic membrane for Bcc members were recently reviewed [186]. B. cenocepacia Pc715j produces both ornibactin and pyochelin [47, 109, 209]. When orbA, a gene encoding for the outer membrane receptor of ferric-ornibactin, is inactivated, the mutant strain shows less virulence than the parent strain in a rat agar bead lung infection model [209]. The orbA mutant is cleared from the lungs, showing that pyochelin uptake cannot compensate for the omibactin system. However, a ptaA mutant from the same B. cenocepacia strain, which is deficient in ferric-pyochelin uptake, persists in the lung in the same animal model, showing that ornibactin uptake is able to compensate a deficiency in the pyochelin system. Both mutants can grow in iron-starvation conditions *in vitro* and produce smaller amounts of the corresponding siderophore [209].

Malleobactin

Malleobactin, a hydroxamate siderophore purified from B. pseudomallei K96243 presents similarities with ornibactins. MbaA, a putative ornithine-N5-oxygenase, and MbaF, a putative NRPS, are involved in its biosynthesis, whereas fmtA is coding for the malleobactin receptor and is involved in the uptake [7]. These genes are part of an operon with mbaJ and mbaI, which are under the control of the sigma factor MbaS [7]. Malleobactin is able to acquire iron from both transferrin and lactoferrin. Because B. pseudomallei initiates infection at the mucosal surface, its ability to take iron from lactoferrin could play an important role in infections, as it is found in most secretions bathing mucosal surfaces [219]. The FmtA receptor can also recognize ornibactin (not produced by B. pseudomallei), and B. cenocepacia's purified ornibactins can cross-feed mbaA mutants [7].

Cepabactin

Cepabactin, or 1-hydroxy-5-methoxy-6-methyl-2(1H)-pyridinone, is a cyclic hydroxamate siderophore that was first identified as a metal-binding antibiotic secreted in the culture medium of *Pseudomonas alcaligenes* NCIB11492 [128]. Some Bcc clinical strains (ATCC 17759 and ATCC 25416 gen. I) were shown to produce cepabactin, although it never was the only siderophore produced [47, 128]. In fact, cepabactin is not widely produced among *Burkholderia* strains, clinical or environmental, which does not preclude its utilization.

Cepaciachelin

Another siderophore, cepaciachelin, was isolated from a culture supernatant of *B. cepacia* PHP7 (now *B. ambifaria*) grown under iron-limiting conditions [12]. Cepaciachelin seems to represent the third subunit of protochelin, a siderophore identified in *Azotobacter vinelandii* [12, 44]. This type of siderophore is among the most effective because it contains three complexing sites for Fe³⁺. The other two subunits of protochelin are azotochelin and aminochelin and have not yet been reported in *Burkholderia* species.

RHAMNOLIPIDS

Rhamnolipids are extracellular glycolipidic surface-active molecules produced by many bacteria. Rhamnolipids have

several potential biotechnological applications owing to their tensioactive properties [168].

A rhamnolipid was detected in the supernatant of B. pseudomallei cultures. This rhamnolipid is composed of two molecules of rhamnoses and two molecules of β hydroxytetradecanoic acid to give 2-O-α-L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradecanoyl- β hydroxytetradecanoate (Rha-Rha-C₁₄-C₁₄). At high concentrations, this rhamnolipid is toxic to nonphagocytic and phagocytic cell lines and displays hemolytic activity on erythrocytes from different species [75]. The hemolytic and cytotoxic activities of the B. pseudomallei rhamnolipid are probably due to its detergent-like properties. At low concentrations, this rhamnolipid changes the cell morphology with modifications of the cytoskeleton organization [76]. B. thailandensis synthesizes a rhamnolipid that is structurally analogous to the B. pseudomallei rhamnolipid [194]. Disruption of the B. thailandensis QS system results in hyper-beta-hemolysis of erythrocytes, which was suggested to result from increased rhamnolipid production [194]. Genes involved in rhamnolipid synthesis have not yet been identified.

TOXINS

Phytopathogenic Burkholderia

Phytopathogenic bacteria produce phytotoxins that are toxic to plant cells and influence symptoms development.

Toxoflavin

B. glumae causes rot of rice grains and seedlings (panicle blight) and is a limiting factor of rice yield throughout ricegrowing countries (United States, Japan, the Philippines, and Korea) [45, 182]. Moreover, B. glumae can also cause wilting symptoms in solanaceous crops [88]. B. glumae produces bright yellow pigments, identified as toxoflavin {1.6-dimethylpyrimido[5,4-e]-1,2,4-triazine-5,7(1H,6H)dione) and fervenulin (a tautomeric isomer of toxoflavin), which are essential for the pathogenicity of rice seedling rot and grain rot [93, 182]. A toxoflavin-deficient mutant fails to cause disease symptoms in plants. Toxoflavin also has antibacterial, antifungal, and herbicidal activities [135]. Recently, toxoflavin was identified as a potential novel anticancer agent by its action against Polo-like kinase (involved in signal transduction) [70]. Toxoflavin acts in various microorganisms and cell extracts as an electron carrier between NADH and oxygen, and it can produce hydrogen peroxide or superoxide anion [102]. Toxoflavin is also produced by several strains of B. gladioli [196].

In *B. glumae*, the biosynthesis and transport of toxoflavin involve, respectively, the *toxABCDE* and the *toxFGHI* operons, which are regulated by the LysR family regulator ToxR, with toxoflavin acting as a co-inducer [93]. The Tofl-TofR(C₈-HSL) QS system regulates toxoflavin production and transport *via* the transcriptional activator ToxJ [93]. In

B. glumae, a tofI mutant fails to produce phytotoxins and causes much less severe panicle blight than that produced by the wild type. Kim et al. [93] suggested that since toxoflavin production consumes large amounts of energy, B. glumae cells must ensure that they reach a critical cell density before they start to produce it [93]. This is the only study demonstrating that QS is involved in the pathogenicity of phytopathogenic bacteria by regulating a phytotoxin production. Toxoflavin production is also dependent on growth temperature, which is maximal at 37°C [124].

Tropolone

B. plantarii (also known as Pseudomonas plantarii), a rice phytopathogen, is often co-isolated with B. glumae, suggesting that they may share similar transmission paths and life cycle [36, 197]. B. plantarii and B. glumae induce similar symptoms on rice. The virulence of B. plantarii was associated with production of the phytotoxin tropolone, which is also produced by some other Pseudomonas and Burkholderia spp. including B. glumae. Tropolone is a non-benzenoid aromatic compound that has properties characteristic of phenol and acids. Tropolone causes root growth inhibition and wilting of seedlings, symptoms that are typically caused by the pathogen itself [10]. Its activity is inhibited by the presence of iron [10]. This compound is toxic to rice seedlings but also exhibits antimicrobial and antifungal activities, especially against Pythium aphanidermatum [133, 189]. Tropolone displays strong insecticidal activity on Tyrophagus putrescentiae (mould mite) and Dermatophagoides farinae. This activity is even higher than that of N, N-diethyl-m-toluamide [133].

The PlaI-PlaR QS system plays an important role in the ability of *B. plantarii* to cause rice seedling blight disease: a *plaI* mutant is less virulent than the wild type. However, it is not known whether QS regulates tropolone synthesis [173].

Rhizobitoxine

Rhizobitoxine, an enol-ether amino acid [2-amino-4-(2-amino-3-hydroxypropoxy)-trans-but-3-enoic acid] is synthesized by the legume symbiont Bradyrhizobium elkanii and the plant pathogen B. andropogonis [131]. These strains also produce dihydrorhizobitoxine [131]. B. andropogonis causes chlorotic symptoms in corn and sorghum, presumably as a result of rhizobitoxine production in planta [131]. Rhizobitoxine also plays a positive role in establishing symbiosis between B. elkanii and host legumes [53]. Rhizobitoxine inhibits cystathionine-β-lyase in methionine biosynthesis and 1-aminocyclopropane-1carboxylate (ACC) synthase in the ethylene biosynthesis pathway [225]. ACC synthase is the rate-limiting enzyme in the ethylene biosynthesis pathway in plants [118]. Inhibition of ethylene biosynthesis by rhizobitoxine enhances the nodulation process and nodulation competitivenes [53]. B. andropogonis probably produces rhizobitoxine to inhibit ethylene biosynthesis and reduce defence reactions by the host plants [141]. However, in *B. elkanii*, it was shown recently that rhizobitoxine-induced foliar chlorosis is the result of methionine deficiency due to inhibition of cystathione- β -lyase [141].

The genes involved in rhizobitoxine biosynthesis have been identified in *B. elkanii* as *rtxA* and *rtxC* [221]. However, these genes have not been isolated from *B. andropogonis*.

Rhizoxin

Rhizoxin, a macrocyclic polyketide, is the causative agent of the rice seedling blight. This phytotoxin exerts its effect by binding to rice β-tubulin, which results in inhibition of mitosis and cell cycle arrest [96]. The blockage of microtubule formation has been observed in many other eukaryotic cells, including human and murine tumor cells. Additionally, rhizoxin can depolymerize assembled microtubules [183]. Rhizoxin demonstrates broad antitumor activity in vitro [187, 190]. Rhizoxin has undergone extensive clinical trials as a potential antitumor drug candidate [101]. For many years, the fungus Rhizopus microsporus was assumed to synthesize rhizoxin. However, recent evidence indicate that it is instead produced by a symbiotic bacteria of the genus Burkholderia residing within the fungal mycelium [146]. Curing the fungus of the bacteria with an antibiotic treatment, which resulted in a nonproducing phenotype, unequivocally established the role of the rhizoxin. In pure culture, the endosymbiont produces rhizoxin, and the re-inoculation of the cured fungal strain with the symbiotic Burkholderia re-establishes a rhizoxin-produced fungal bacterial symbiosis. The name Burkholderia rhizoxina was proposed for this symbiotic bacterium [148]. Novel rhizoxin derivatives isolated from a scaled-up fermentation of the cultured B. rhizoxina strain are 1,000 times more active than rhizoxin in antimitotic bioassays [162]. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis has been isolated in the genome of B. rhizoxina [148]. Recently, Partida-Martinez et al. [147] found that rhizonin is also produced by an endosymbiont *Burkholderia* (see below).

OTHER TOXINS

Bongkrek Acid

Tempe bongkrek is an Indonesian food made by fermentation of coconut. Consumption of tempe bongkrek is associated with a foodborne human intoxication and significant numbers of mortalities. The main symptom is a strong hyperglycemia followed by hypoglycemia [78]. The causative organism B. gladioli pathovar cocovenenans (also referred to as Pseudomonas cocovenenans and B. cocovenenans) produces two toxins, toxoflavin (discussed above) and bongkrekic acid (also commonly referred to as bongkrek acid) [36]. Bongkrekic acid is an inhibitor of adenine

nucleotide translocase, which is a component of the mitochondrial permeability transition pore complex [78]. It is also an inhibitor of apoptosis by preventing a number of phenomena: generation of reactive oxygen species, chromatin condensation, and cytoplasmic vacuolization [78, 122]. *Pseudomonas farinofermentans* strains isolated from acase of food poisoning caused by the consumption of fermented corn flour in China are now know to be *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* [228].

Rhizonin

Rhizonins A and B were known as mycotoxins from *Rhizopus microsporus*, a fungus that is traditionally used in many food fermentations; for example, for soybean *tempeh* production in Indonesia [87]. Rhizonins A and B have a strong hepatotoxic activity [217]. In animal tests, rhizonins cause hepatic lesions and induce acute and chronic failure of the liver [217]. However, this toxin, like rhizoxin, is not produced by the fungus but by bacteria that reside within the fungal mycelium. Phylogenetic analyses revealed that this symbiont belongs to the genus *Burkholderia* [147]. Pure rhizonin A can be isolated from a scaled-up culture of this *Burkholderia* strain [147].

ANTIFUNGALS AND OTHER ANTIMICROBIALS

Organisms such as *Burkholderia* produce a wide range of antifungals and other compounds that are able to suppress many soilborne plant pathogens (e.g., R. solani, Pythium spp., Fusarium spp.) and in doing so improve plant health. For example, B. ambifaria LMG 19182 (B. ambifaria AMMD) is very effective in controlling phytopathogenic Pythium species and Aphanomyces euteiches [38]. Various strains of Burkholderia have been reported to produce a large variety of antifungals such as altericidins, pyrrolnitrin, and xylocandins (also called cepacidines) [16, 54, 94].

Pyrrolnitrin

Pyrrolnitrin [3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole] is a secondary metabolite derived from tryptophan, first

isolated from *B. pyrrocinia* (originally *Pseudomonas pyrrocinia*) [8]. It is produced by several strains of *Pseudomonas* and *Burkholderia* [21, 56] and also *Enterobacter agglomerans*, *Serratia plymuthica*, and *Myxococcus* isolates [31, 65, 143].

This active metabolite has been used as a clinical antifungal agent to treat humans infected by opportunistic fungi. Phenylpyrrole derivatives (fenpiclonil and fludioxonil) have been developed by Norvatis as agricultural fungicides [185]. Pyrrolnitrin prevents fungal growth by inhibiting the respiratory electron transport system [54].

Pyrrolnitrin produced by *B. cepacia* NB-1 exhibits a broad spectrum of activity against phytopathogenic fungi and Gram-positive bacteria, with a particular efficiency against *Streptomyces*, whereas Gram-negative bacteria, except *Proteus vulgaris*, are resistant [54]. Pyrrolnitrin production by *B. cepacia* NB-1 is influenced by nutritional and environmental factors, with glycerol strongly enhancing the antifungal production [54]. Pyrrolnitrin produced by *B. cepacia* B37w exhibits antifungal activity against the potato dry rot fungus *Fusarium sambucinum* [21].

The *prnABCD* gene cluster encodes the four biochemical steps to produce pyrrolnitrin from tryptophan by *P. fluorescens* [95]. This cluster was identified in *B. cepacia* LT4-12W and in *B. pyrrocinia* [73]. In *P. fluorescens*, *B. pyrrocinia*, and *B. cepacia* LT4-12W, genes are arranged identically and in a linear relationship to the order of the biochemical reactions for pyrrolnitrin synthesis [73]. De Souza and Raaijmakers [48] suggested that the *Burkholderia* pyrrolnitrin synthase gene was acquired from *Pseudomonas* by horizontal transfer.

Regulation of pyrrolnitrin biosynthesis is not well documented in *Burkholderia* strains. It was reported that QS is required for its production in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica* [112]. It is therefore possible that QS is required also for production in *Burkholderia* strains.

Xylocandin Complex

Xylocandin (also called cepacidines A and B) is a complex of peptides with potent anticandidal and antidermatophytic

Table 4. Toxins.

Class	Regulation	Species	Secretion
Toxoflavin	TofiR [93]	B. glumae	Efflux pump [93], toxFGH
	ND	B. gladioli	ND
Tropolone	Iron and temperature [10]	B. plantarii	ND
	ND	B. glumae	ND
Rhizobitoxine	ND	B. andropogonis	ND
Rhizoxin	ND	Endosymbiotic Burkholderia	ND
Bongkrek acid	ND	B. gladioli pathovar cocovenenans	ND
Rhizonin	ND	Endosymbiotic Burkholderia	ND

ND: Not determined.

activities that is produced by *B. pyrrocinia* ATCC 39277 (originally *P. cepacia*), a strain isolated from cornfield soil in New Jersey (U.S.A.) [16]. Cepacidine A has been found in culture broth of *B. cepacia* AF2001 (originally *P. cepacia*) and exhibits high *in vitro* antifungal activity against pathogenic fungi, that showing no activity against bacteria [106]. In semi-greenhouse biocontrol assays, this strain displayed excellent biological activity against *Pythium ultimum* on cotton and cucumbers [105]. Moreover, cepacidine A was found to have potent immunosuppressive activity, significantly suppressing the activation of B lymphocytes [104].

B. cepacia BC11 inhibits the growth of R. solani and Sclerotium rolfsii in soils and enhances the yield of peanuts [91]. This strain produces a lipopeptide, called AFC-BC11, with characteristics of members of the xylocandin family. However, unlike xylocandins, AFC-BC11 is not active against Candida spp. Nonetheless, AFC-BC11 is very active against various plant pathogenic fungi [91]. A region of the genome of strain BC11 that is required for production of this antifungal metabolite was characterized. This region encodes proteins involved in the production of a nonribosomally synthesized lipopeptide [91].

Quinoline Derivatives

The phytophthora blight of red pepper is a plant disease caused by Phytophtora capsici. B. cepacia PCII inhibits the mycelial growth and zoosporangial germination of P. capsici. Inoculation of this strain promotes red pepper plant growth [132]. B. cepacia PCII produces several 4quinolinone metabolites (or pseudanes): [2-(2-heptenyl)-3methyl-4-quinolinone] (HMQ), and 3-methyl-2-(2-nonenyl)-4-quinolinone (NMQ). HMQ exhibits in vitro antifungal activity against P. capsici, F. oxysporum, and R. solani [132]. Treatment of red pepper seeds with HMQ resulted in an increase in weight and height of plants after 30 days [132]. HMQ and NMQ are also synthetized by B. cepacia RB245, a strain isolated from a lettuce root and showing activity against several fungal pathogens including Pyricularia orvzae, and R. solani, but relatively limited antibacterial activity [81].

Glidobactins

Burkholderia spp. K481-B101 (originally assigned as Polyangium brachysporum) produces glidobactins [161], acylated tripeptides that contain a 12-membered ring consisting in most variants of the two nonproteinogenic amino acids erythro-4-hydroxy-L-lysine and 4(S)-amino-2(E)-pentenoic acid. The ring structure is linked to an L-threonine residue, which in turn is acylated by different variant-specific unsaturated fatty acids [161]. These compounds were also isolated from B. cepacia and designated cepafungin [167]. Glidobactins exhibit broad inhibitory

action against fungi and yeasts, as well as antitumor activity [140, 167].

A gene cluster (glbA-glbH) involved in glidobactin biosynthesis has been identified in Burkholderia strain K481-B101. This gene cluster was also found in the ten completely sequenced B. pseudomallei strains. Interestingly, in the nine sequenced B. mallei strains, this cluster is inactivated by a transposon [161].

CF661

B. cepacia CF66 produces the antifungal compound CF661, which inhibits the growth of some soilborne fungi such as R. solani, Aspergillus flavus, and F. oxysporum [150]. Strain CF66 exhibits strong antimicrobial activity against yeasts such as C. albicans, but no activity against bacteria. CF661 completely inhibits the hyphal growth of R. solani. The exact structure of this compound is not known, but based on nuclear magnetic resonance analysis, and GC-MS spectral and infrared spectral data, CF661 is confirmed to have amide bonds, α-metyl fatty acid, bromine, and some structural units such as CH₂CH₂O [150].

Antifungal Compounds from Burkholderia Strain MP-1

Burkholderia strain MP-1, isolated from the rhizosphere, exhibits antifungal activities against various filamentous plant pathogenic fungi (F. oyxsporum, R. solani). This strain produces at least four antifungal substances: phenylacetic acid, hydrocinnamic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, and 4-hydroxyphenylacetate methyl ester [121]. These four substances exhibit antifungal activity against several pathogenic fungi. Phenylacetic acid, a deamination product of phenylalanine, is known as a plant growth regulator (auxin activity) and it displays growth-inhibitory activity towards bacteria and fungi (R. solani, Pythium ultimum) [85, 134]. It may be involved in defence mechanisms, protecting the producing strain from competing cells.

OTHER ANTIFUNGALS

2-Hydroxymethyl-chroman-4-one

Burkholderia sp. MSSP was isolated from roots of Mimosa pudica and secretes an antifungal compound against R. solani, P. ultimum, and Botrytis cinerea [91]. An antifungal compound was identified as 2-hydroxymethyl-chroman-4-one and exhibits activities against several plant pathogenic fungi [91].

Altericidins

Altericidins, a complex of closely related oligopeptides, were isolated from the culture broth of *B. cepacia* KB-1. The altericidin complex inhibits the germination of *Alternaria kikuchiana* conidia (a black spot fungus of pear). It was

proposed that altericidins might act on the cytoplasmic membrane [94].

Cepacins A and B

Cepacins A and B have been isolated from *B. cepacia* SC 11 783 (originally *P. cepacia*). These antibiotics exhibit only antibacterial activity against staphylococci and Gramnegative microorganisms [145].

Cepaciamides A and B

B. cepacia D-202 is a biological control agent against Botrytis cinerea and Penicillium expansum, which causes beet roots rot in Japan. This strain produces the 3-amino-2-piperidinone-containing lipids cepaciamides A and B, which exhibit an activity against B. cinerea [223].

Hydrogen Cyanide

Several bacterial species are known to produce and excrete hydrogen cyanide (HCN), a potent inhibitor of cytochrome C oxidase [17]. For example, HCN production by strain P. fluorescens CHAO suppresses black root rot of tobacco caused by Thielaviopsis basicola [17]. The production of HCN has been rarely described in the genus Burkholderia. The endophytic plant growth-promoting Burkholderia sp. strain MSSP, isolated from root nodules of Mimosa pudica, produces HCN, but its role is unknown [144].

Phenazines

Phenazines are naturally occurring pigments produced by bacteria and are known for their antibiotic properties, and antitumor and antiparasitic activities [103]. For example, phenazine-1-carboxylic acid produced by *P. fluorescens* is important for the control of take-all disease of wheat, which is caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [32]. Phenazine producers have been identified as organisms belonging to a range of species like *Pseudomonads*, members of the *Streptomyces* genus, *B. cepacia*, and *B. phenazinium* (for a recent review see [103]).

B. phenazinium (previously known as Pseudomonas phenazinium) produces ten phenazine pigments, predominantly iodinin [13]. B. cepacia strain 5.5B, isolated from soil, produces a purple pigment identified as 4,9-dihydroxyphenazine-1,6-dicarboxylic acid dimethyl ester, a phenazine [25]. This compound inhibits in vitro the phytopathogenic fungi R. solani [25].

Volatile Compounds

Volatile compounds (molecular weight less than 300, low polarity, and a high vapor pressure) can act as antibiotics and affect fungal mycelial growth [86, 214]. *B. cepacia* RJ3 and ATCC 52796 (originally *P. cepacia*) inhibit several fungal plant pathogens. These strains inhibit the fungi by producing unidentified inhibitory volatile compound(s).

The volatile compound(s) of *B. cepacia* moderately inhibits the growth of *R. solani* [90].

Unknown Antifungals

The biocontrol strain *B. ambifaria* BC-F exhibits broad-spectrum antifungal activity against important soilborne pathogens and suppresses diseases caused by fungal pathogens on a number of important crop plants [110]. The nature of this antifungal compound is not known. Interestingly, QS deficient mutants of *B. ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity [229].

Burkholderia strain 2.2 N isolated from soil is capable of inhibiting the growth of plant-pathogenic fungi, yeasts, and protozoa. An extracellular compound seems to be responsible for this activity [24].

PHYTOHORMONES

Beneficial bacteria that stimulate growth of cereals and grasses are usually referred to as plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR), a group that includes different bacterial species belonging to genera such as Acetobacter, Azospirillum, Bacillus, Pseudomonas, Herbaspirillum, and Burkholderia [52]. PGPR exert their beneficial effects on plant growth directly or indirectly through various mechanisms. Indirect effects rely on preventing deleterious functions of pathogenic microorganisms, generally by the production of antibiotics or antifungal compounds or by competing for nutrients like iron [52]. Several strains of Burkholderia can antagonize and repress the growth of many soilborne plant pathogens (see above). Direct mechanisms include the synthesis of phytohormones and vitamins, inhibition of plant ethylene synthesis, improved nutrient uptake, solubilization of inorganic phosphate, or mineralization of organic phosphate.

Several *Burkholderia* species exert beneficial effects on their plant hosts. For example, *B. vietnamiensis* is recognized for its abilities to promote rice plant growth: the inoculation of strain TVV75 resulted in a final 13% to 22% increase in grain yield [188]. Similarly, *B. phytofirmans* strain PsJN inoculation stimulates grapevine growth and enhances resistance to cold stress [6]. *B. ambifaria* MCI-7 enhances the growth of *Zea mays* [35].

Bacterial production of phytohormones can explain the changes in root morphology following *Burkholderia* inoculation. The plant hormones auxins and cytokinins are involved in several stages of plant growth and development, such as cell elongation, cell division, tissue differentiation, and apical dominance [226]. However, there are only a few reports on the phytohormone biosynthetic capacities of *Burkholderia*. The most important auxin, indole-3 acetic acid, is produced by several strains of *B. cepacia* isolated from the rhizosphere, by an endophytic

Table 5. Effector proteins.

Class	Genes	Regulation	Species	Secretion
Effector proteins Autosecreted protein Plant cytotoxic protein	bopA, bopB, bopE bimA ND	ND ND CepIR [5]	B. pseudomallei B. pseudomallei B. cenocepacia	Type III secretion pathway [74] Type V secretion pathway ND

ND: Not determined.

Burkholderia isolated from root nodules of Mimosa piduca, and by B. vietnamiensis MGK3 isolated from rice root [14, 144].

EFFECTOR PROTEINS

Burkholderia Secretion Apparatus: Effector Proteins

B. pseudomallei is a facultative intracellular pathogen; it can invade nonphagocytic host cells and survive and replicate within phagocytes. B. pseudomallei contains at least three loci encoding putative type III secretion systems (TTSS) [152, 178]. TTSS, central to the virulence of many Gram-negative pathogens, resembles molecular syringes for the injection of multiple bacterial effector proteins directly into the host cell cytoplasm [43]. Effector proteins subvert host cell processes to the benefit of the invader. For example, the type III protein secretion apparatus BSA (Burkholderia secretion apparatus) is required for full virulence of B. pseudomallei in mice [177]. The bsa locus is also present in B. mallei and B. cenocepacia genomes [177]. Several effector proteins encoded within the bsa locus have been identified in the B. pseudomallei genome (BopA, BopB, and BopE) [177] (Table 5).

BopE facilitates the invasion of nonphagocytic epithelial cells. BopE shares sequence homology with the translocated effector proteins SopE and SopE2 of Salmonella, proteins that play an important role in Salmonella invasion of nonphagocytic intestinal epithelial cells. In eukaroytic cells (HeLa cells), BopE induces rearrangements in the subcortical actin cytoskeleton, likely by acting as a guanine nucleotide exchange factor for RhoGTPases, that regulate the actin network [195]. The bopE gene is also present in the B. mallei and B. thailendensis genomes [177].

BopB contains an amino acid motif (CX5R) that is conserved in the catalytic domains of numerous phosphatases, like the type III secreted protein of Salmonella SobB. The latter influences inositol phosphate signalling pathways in eukaryotic cells as well as bacterial invasion [179]. BopA is a homolog of the Shigella type III secreted protein IscB, which mediates cell-to-cell spread of Shigella [179]. The exact role of BopA is not known, but B. pseudomallei is also capable of cell-to-cell spread. In mice, B. pseudomallei bopA⁻ and bopB⁻ mutants are less virulent than wild type, causing a delay in median time to death [179].

Other Proteins

BimA (<u>Burkholderia</u> intracellular <u>motility</u> A), an autosecreted protein, is localized at the pole of the bacteria and is required for actin-based motility in a macrophage-like cell line [180]. Mutation of *bimA* abolishes the actin-based motility of *B. pseudomallei* in a cell line [180].

B. cenocepacia strain K56-2 is capable of causing a plant tissue watersoaking phenotype (ptw) that results from loss of cell membrane integrity and the accumulation of fluids in the intracellular spaces of plant tissue [57]. In strain K56-2, a type IV secretion system is responsible for the secretion of a plant cytotoxic protein, which causes plasmolysis of plant protoplasts [57].

CONCLUSION

The large variety of extracellular products synthesized by *Burkholderia* species correlates with its important ecological diversity and might explain its versatility. Although a lot of information is published on *Burkholderia* secondary metabolites, effectors, and other exoproducts, sequencing of the genomes will improve knowledge on that matter. Studies on regulation of exoproduction in *Burkholderia* will introduce interesting perspectives about the adaptation, survival, and pathogenesis of these bacteria. This will also favor the optimization of production of various enzymes for industrial purposes.

Acknowledgrment

Ludovic Vial and Marie-Christine Groleau contributed equally to this work.

REFERENCES

- Aamand, J. L., A. H. Hobson, C. M. Buckley, S. T. Jorgensen, B. Diderichsen, and D. J. McConnell. 1994. Chaperone-mediated activation in vivo of a Pseudomonas cepacia lipase. Mol. Gen. Genet. 245: 556-564.
- Achouak, W., R. Christen, M. Barakat, M. H. Martel, and T. Heulin. 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 787-794.

- Agnoli, K., C. A. Lowe, K. L. Farmer, S. I. Husnain, and M. S. Thomas. 2006. The omibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function sigma factor which is a part of the Fur regulon. *J. Bacteriol.* 188: 3631–3644.
- Aguilar, C., I. Bertani, and V. Venturi. 2003. Quorumsensing system and stationary-phase sigma factor (rpoS) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar 1 type strain, ATCC 25416. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1739– 1747.
- Aguilar, C., A. Friscina, G. Devescovi, M. Kojic, and V. Venturi. 2003. Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. J. Bacteriol. 185: 6456–6462.
- Ait Barka, E., J. Nowak, and C. Clement. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, Burkholderia phytofirmans strain PsJN. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7246-7252.
- Alice, A. F., C. S. Lopez, C. A. Lowe, M. A. Ledesma, and J. H. Crosa. 2006. Genetic and transcriptional analysis of the siderophore malleobactin biosynthesis and transport genes in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* K96243. *J. Bacteriol.* 188: 1551–1566.
- Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 28: 575-576.
- Ashdown, L. R. and J. M. Koehler. 1990. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 28: 2331–2334.
- Azegami, K., K. Nishiyama, and H. Kato. 1988. Effect of iron limitation on "Pseudomonas plantarii" growth and tropolone and protein production. Appl. Environ. Microbiol. 54: 844-847.
- Baldwin, A., P. A. Sokol, J. Parkhill, and E. Mahenthiralingam. 2004. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun.* 72: 1537–1547.
- Barelmann, I., J. M. Meyer, K. Taraz, and H. Budzikiewicz. 1996. Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from Burkholderia (Pseudomonas) cepacia. Z. Naturforsch. C J. Biosci. 51: 627-630.
- Bell, S. C. and J. M. Turner. 1973. Iodinin biosynthesis by a Pseudomonad. Biochem. Soc. Trans. 1: 751-753.
- Bevivino, A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V. Carusi, M. Del Gallo, and P. Visca. 1994. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia* cepacia. Microbiology 140(Pt 5): 1069–1077.
- Bevivino, A., C. Dalmastri, S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. L. Belli, S. Piana, A. Materazzo, P. Vandamme, and G. Manno. 2002. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: Genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J. Clin. Microbiol.* 40: 846–851.
- Bisacchi, G. S., D. R. Hockstein, W. H. Koster, W. L. Parker, M. L. Rathnum, and S. E. Unger. 1987. Xylocandin: A new

- complex of antifungal peptides. II. Structural studies and chemical modifications. *J. Antibiot. (Tokyo)* **40:** 1520–1529.
- Blumer, C. and D. Haas. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiol. 173: 170-177.
- Boekema, B. K., A. Beselin, M. Breuer, B. Hauer, M. Koster, F. Rosenau, K. E. Jaeger, and J. Tommassen. 2007.
 Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3838–3844.
- Bramer, C., P. Vandamme, L. da Silva, J. Gomez, and A. Steinbuchel. 2001. Burkholderia sacchari sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1709-1713.
- Brett, P. J., D. DeShazer, and D. E. Woods. 1998. Burkholderia thailandensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 317–320.
- Burkhead, K. D., D. A. Schisler, and P. J. Slininger. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2031–2039.
- Burkholder, W. H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onions bulbs. *Phytopathology* 40: 115–117.
- Caballero-Mellado, J., L. Martinez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, and P. E. Santos. 2004. Burkholderia unamae sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172.
- Cain, C. C., A. T. Henry, R. H. Waldo 3rd, L. J. Casida Jr., and J. O. Falkinham 3rd. 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broadspectrum antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 4139-4141.
- Cartwright, D. K., W. S. Chilton, and D. M. Benson. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 211–216.
- Carvalho, A. P., G. M. Ventura, C. B. Pereira, R. S. Leao, T. W. Folescu, L. Higa, L. M. Teixeira, M. C. Plotkowski, V. L. Merquior, R. M. Albano, and E. A. Marques. 2007. Burkholderia cenocepacia, B. multivorans, B. ambifaria, and B. vietnamiensis isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. APMIS 115: 311–318.
- Chain, P. S., V. J. Denef, K. T. Konstantinidis, L. M. Vergez, L. Agullo, V. L. Reyes, L. Hauser, M. Cordova, L. Gomez, M. Gonzalez, M. Land, V. Lao, F. Larimer, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, S. A. Malfatti, C. J. Marx, J. J. Parnell, A. Ramette, P. Richardson, M. Seeger, D. Smith, T. Spilker, W. J. Sul, T. V. Tsoi, L. E. Ulrich, I. B. Zhulin, and J. M. Tiedje. 2006. Burkholderia xenovorans LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 15280–15287.
- Chen, W. M., E. K. James, T. Coenye, J. H. Chou, E. Barrios,
 S. M. de Faria, G. N. Elliott, S. Y. Sheu, J. I. Sprent, and
 P. Vandamme. 2006. Burkholderia mimosarum sp. nov.,
 isolated from root nodules of Mimosa spp. from Taiwan

- and South America. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1847-1851.
- Chen, W. M., S. M. de Faria, E. K. James, G. N. Elliott, K. Y. Lin, J. H. Chou, S. Y. Sheu, M. Cnockaert, J. I. Sprent, and P. Vandamme. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1055–1059.
- Cheng, A. C. and B. J. Currie. 2005. Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev. 18: 383-416.
- Chernin, L. S., A. Brandis, Z. F. Ismailov, and I. Chet. 1996.
 Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr. Microbiol.* 32: 1...5
- Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg, and B. J. J. Lugtenberg. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by Pseudomonas bacteria. New Phytol. 157: 503-523.
- Chowdhury, P. R. and J. A. Heinemann. 2006. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. agaricicola BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3558–3565.
- Christenson, J. C., D. F. Welch, G. Mukwaya, M. J. Muszynski, R. E. Weaver, and D. J. Brenner. 1989. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 270–273.
- Ciccillo, F., A. Fiore, A. Bevivino, C. Dalmastri, S. Tabacchioni, and L. Chiarini. 2002. Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MC1 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environ. Microbiol.* 4: 238–245.
- Coenye, T., B. Holmes, K. Kersters, J. R. Govan, and P. Vandamme. 1999. Burkholderia cocovenenans (van Damme et al., 1960) Gillis et al., 1995 and Burkholderia vandii Urakami et al., 1994 are junior synonyms of Burkholderia gladioli (Severini, 1913) Yabuuchi et al., 1993 and Burkholderia plantarii (Azegami et al., 1987) Urakami et al., 1994, respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 37–42.
- Coenye, T., S. Laevens, A. Willems, M. Ohlen, W. Hannant, J. R. Govan, M. Gillis, E. Falsen, and P. Vandamme. 2001. Burkholderia fungorum sp. nov. and Burkholderia caledonica sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1099-1107.
- Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2001. Burkholderia ambifaria sp. nov., a novel member of the Burkholderia cepacia complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1481–1490.
- Coenye, T., P. Vandamme, J. R. Govan, and J. J. LiPuma.
 Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427–3436.
- Coenye, T., D. Henry, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2004.
 Burkholderia phenoliruptrix sp. nov., to accommodate the

- 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. Syst. Appl. Microbiol. 27: 623-627.
- Conway, B. A. and E. P. Greenberg. 2002. Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia* vietnamiensis. J. Bacteriol. 184: 1187–1191.
- Corbett, C. R., M. N. Burtnick, C. Kooi, D. E. Woods, and P. A. Sokol. 2003. An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* 149: 2263– 2271.
- Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 811–825.
- Cornish, A. S. and W. J. Page. 1995. Production of the triacetecholate siderophore protochelin by Azotobacter-Vinelandii. Biometals 8: 332–338.
- Cottyn, B., M. T. Cerez, M. F. Van Outryve, J. Barroga, J. Swings, and T. W. Mew. 1996. Bacterial diseases of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Dis.* 80: 429–437.
- Cox, C. D. and R. Graham. 1979. Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 137: 357–364.
- Darling, P., M. Chan, A. D. Cox, and P. A. Sokol. 1998.
 Siderophore production by cystic fibrosis isolates of Burkholderia cepacia. Infect. Immun. 66: 874–877.
- De Souza, J. T. and J. M. Raaijmakers. 2003. Polymorphisms within the *prnprnD* and *pltpltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 21–34.
- De Voss, J. J., K. Rutter, B. G. Schroeder, H. Su, Y. Zhu, and C. E. Barry 3rd. 2000. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 97: 1252-1257.
- DeShazer, D., P. J. Brett, M. N. Burtnick, and D. E. Woods. 1999. Molecular characterization of genetic loci required for secretion of exoproducts in *Burkholderia pseudomallei*. J. Bacteriol. 181: 4661-4664.
- Devescovi, G., J. Bigirimana, G. Degrassi, L. Cabrio, J. J. Lipuma, J. Kim, I. Hwang, and V. Venturi. 2007. A clinical isolate of *Burkholderia glumae* causes severe disease symptoms in rice; involvement of a quorum sensing regulated secreted lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* In Press.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, and Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22: 107-149.
- Duodu, S., T. V. Bhuvaneswari, T. J. Stokkermans, and N. K. Peters. 1999. A positive role for rhizobitoxine in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 1082–1089.
- El-Banna, N. and G. Winkelmann. 1998. Pyrrolnitrin from Burkholderia cepacia: Antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. J. Appl. Microbiol. 85: 69-78.
- El Khattabi, M., P. Van Gelder, W. Bitter, and J. Tommassen. 2000. Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J. Biol. Chem.* 275: 26885–26891.

- Elander, R. P., J. A. Mabe, R. H. Hamill, and M. Gorman. 1968.
 Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*.
 VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 16: 753-758.
- 57. Engledow, A. S., E. G. Medrano, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and C. F. Gonzalez. 2004. Involvement of a plasmid-encoded type IV secretion system in the plant tissue watersoaking phenotype of *Burkholderia cenocepacia*. J. Bacteriol. 186: 6015-6024.
- Farmer, K. L. and M. S. Thomas. 2004. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* mutants deficient in pyochelin production: Pyochelin biosynthesis is sensitive to sulfur availability. *J. Bacteriol.* 186: 270–277.
- Fehlner-Gardiner, C. C., T. M. Hopkins, and M. A. Valvano. 2002. Identification of a general secretory pathway in a human isolate of *Burkholderia vietnamiensis* (formerly *B. cepacia* complex genomovar V) that is required for the secretion of hemolysin and phospholipase C activities. *Microb. Pathog.* 32: 249-254.
- Frenken, L. G., M. R. Egmond, A. M. Batenburg, J. W. Bos, C. Visser, and C. T. Verrips. 1992. Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3787–3791.
- Frenken, L. G., J. W. Bos, C. Visser, W. Muller, J. Tommassen, and C. T. Verrips. 1993. An accessory gene, lipB, required for the production of active Pseudomonas glumae lipase. Mol. Microbiol. 9: 579–589.
- Frenken, L. G., A. de Groot, J. Tommassen, and C. T. Verrips. 1993. Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol. Microbiol.* 9: 591–599.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-Luxl family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol*. 176: 269–275.
- Gauthier, Y. P., F. M. Thibault, J. C. Paucod, and D. R. Vidal. 2000. Protease production by *Burkholderia pseudomallei* and virulence in mice. *Acta Trop.* 74: 215–220.
- Gerth, K., W. Trowitzsch, V. Wray, G. Hofle, H. Irschik, and H. Reichenbach. 1982. Pyrrolnitrin from Myxococcus fulvus (Myxobacterales). J. Antibiot. (Tokyo) 35: 1101–1103.
- 66. Gillis, M., T. V. Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and M. P. Fernandez. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of Burkholderia vietnamiensis sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 274–289.
- 67. Gingues, S., C. Kooi, M. B. Visser, B. Subsin, and P. A. Sokol. 2005. Distribution and expression of the ZmpA metalloprotease in the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Bacteriol.* 187: 8247–8255.
- Glass, M. B., J. E. Gee, A. G. Steigerwalt, D. Cavuoti, T. Barton, R. D. Hardy, D. Godoy, B. G. Spratt, T. A. Clark, and P. P. Wilkins. 2006. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4601–4604.

- Glass, M. B., A. G. Steigerwalt, J. G. Jordan, P. P. Wilkins, and J. E. Gee. 2006. Burkholderia oklahomensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species formerly known as the Oklahoma strain of Pseudomonas pseudomallei. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2171-2176.
- Goh, K. C., H. Wang, N. Yu, Y. Zhou, Y. Zheng, Z. Lim, K. Sangthongpitag, L. Fang, M. Du, and X. Wang. 2004. PLK1 as a potential drug target in cancer therapy. *Drug Dev. Res.* 62: 349-361.
- Gonzalez, C. F., E. A. Pettit, V. A. Valadez, and E. M. Provin. 1997. Mobilization, cloning, and sequence determination of a plasmid-encoded polygalacturonase from a phytopathogenic Burkholderia (Pseudomonas) cepacia. Mol. Plant Microbe Interact. 10: 840–851.
- Goris, J., P. De Vos, J. Caballero-Mellado, J. Park, E. Falsen, J. F. Quensen 3rd, J. M. Tiedje, and P. Vandamme. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyldegrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia* xenovorans sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1677– 1681.
- Hammer, P. E., W. Burd, D. S. Hill, J. M. Ligon, and K. van Pee. 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. FEMS Microbiol. Lett. 180: 39-44.
- 74. Haque, A., K. Chu, A. Easton, M. P. Stevens, E. E. Galyov, T. Atkins, R. Titball, and G. J. Bancroft. 2006. A live experimental vaccine against *Burkholderia pseudomallei* elicits CD4+ T cell-mediated immunity, priming T cells specific for 2 type III secretion system proteins. *J. Infect. Dis.* 194: 1241–1248.
- Haussler, S., M. Nimtz, T. Domke, V. Wray, and I. Steinmetz. 1998. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 66: 1588–1593.
- Haussler, S., M. Rohde, N. von Neuhoff, M. Nimtz, and I. Steinmetz. 2003. Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infect. Immun.* 71: 2970–2975.
- Heinrichs, D. E. and K. Poole. 1993. Cloning and sequence analysis of a gene (pchR) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 175: 5882-5889.
- Henderson, P. J. and H. A. Lardy. 1970. Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. J. Biol. Chem. 245: 1319–1326.
- Hobson, A. H., C. M. Buckley, J. L. Aamand, S. T. Jorgensen, B. Diderichsen, and D. J. McConnell. 1993. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5682–5686.
- Holden, M. T., R. W. Titball, S. J. Peacock, A. M. Cerdeno-Tarraga, T. Atkins, L. C. Crossman, T. Pitt, C. Churcher, K. Mungall, S. D. Bentley, M. Sebaihia, N. R. Thomson, N. Bason, I. R. Beacham, K. Brooks, K. A. Brown, N. F. Brown, G. L. Challis, I. Cherevach, T. Chillingworth, A. Cronin, B. Crossett, P. Davis, D. DeShazer, T. Feltwell, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. E. Keith, M. Maddison, S. Moule, C. Price, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, M. Simmonds,

- S. Songsivilai, K. Stevens, S. Tumapa, M. Vesaratchavest, S. Whitehead, C. Yeats, B. G. Barrell, P. C. Oyston, and J. Parkhill. 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 101: 14240–14245.
- Homma, Y., Z. Sato, F. Hirayama, K. Konno, H. Shirahama, and T. Suzui. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas* cepacia as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21: 723–728.
- Huber, B., K. Riedel, M. Hentzer, A. Heydorn, A. Gotschlich, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2001. The cep quorumsensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147: 2517–2528.
- Huber, B., F. Feldmann, M. Kothe, P. Vandamme, J. Wopperer, K. Riedel, and L. Eberl. 2004. Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.* 72: 7220–7230.
- Hutchison, M. L., I. R. Poxton, and J. R. Govan. 1998. Burkholderia cepacia produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. Infect. Immun. 66: 2033–2039.
- Hwang, B. K., S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee, and S. S. Moon. 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from Streptomyces humidus. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3739–3745
- Jayaswal, R. K., M. Fernandez, R. S. Upadhyay, L. Visintin, M. Kurz, J. Webb, and K. Rinehart. 1993. Antagonism of Pseudomonas cepacia against phytopathogenic fungi. Curr. Microbiol. 26: 17-22.
- Jennessen, J., K. F. Nielsen, J. Houbraken, E. K. Lyhne, J. Schnurer, J. C. Frisvad, and R. A. Samson. 2005. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1833–1840.
- Jeong, Y., J. Kim, S. Kim, Y. Kang, T. Nagamatsu, and I. Hwang. 2003. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87: 890–895.
- Jorgensen, S., K. W. Skov, and B. Diderichsen. 1991.
 Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* 173: 559-567.
- Kai, M., U. Effmert, G. Berg, and B. Piechulla. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch. Microbiol. 187: 351-360.
- Kang, J. G., S. Y. Shin, M. J. Kim, V. Bajpai, D. K. Maheshwari, and S. C. Kang. 2004. Isolation and anti-fungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by *Burkholderia* sp. MSSP. J. Antibiot. (Tokyo) 57: 726-731.
- Kim, H. B., M. J. Park, H. C. Yang, D. S. An, H. Z. Jin, and D. C. Yang. 2006. Burkholderia ginsengisoli sp. nov., a betaglucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2529-2533.

- Kim, J., J. G. Kim, Y. Kang, J. Y. Jang, G. J. Jog, J. Y. Lim, S. Kim, H. Suga, T. Nagamatsu, and I. Hwang. 2004. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in Burkholderia glumae. Mol. Microbiol. 54: 921-934.
- Kirinuki, T., T. Ichiba, and K. Katayama. 1984. General survey of action site of altericidins on metabolism of *Alternaria* kikuchiana and *Ustilago maydis*. J. Pestic. Sci. 9: 601–610.
- Kirner, S., P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K. H. van Pee, and J. M. Ligon. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol. 180: 1939– 1943.
- Koga-Ban, Y., T. Niki, Y. Nagamura, T. Sasaki, and Y. Minobe. 1995. cDNA sequences of three kinds of beta-tubulins from rice. DNA Res. 2: 21-26.
- 97. Kooi, C., C. R. Corbett, and P. A. Sokol. 2005. Functional analysis of the *Burkholderia cenocepacia* ZmpA metalloprotease. *J. Bacteriol.* 187: 4421–4429.
- Kooi, C., B. Subsin, R. Chen, B. Pohorelic, and P. A. Sokol. 2006. Burkholderia cenocepacia ZmpB is a broadspecificity zinc metalloprotease involved in virulence. Infect. Immun. 74: 4083–4093.
- Korbsrisate, S., N. Suwanasai, A. Leelaporn, T. Ezaki, Y. Kawamura, and S. Sarasombath. 1999. Cloning and characterization of a nonhemolytic phospholipase C gene from *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 37: 3742–3745.
- 100. Korbsrisate, S., A. P. Tomaras, S. Damnin, J. Ckumdee, V. Srinon, I. Lengwehasatit, M. L. Vasil, and S. Suparak. 2007. Characterization of two distinct phospholipase C enzymes from *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 153: 1907–1915.
- Lafontaine, J. A., D. P. Provencal, C. Gardelli, and J. W. Leahy. 2003. Enantioselective total synthesis of the antitumor macrolide rhizoxin D. J. Org. Chem. 68: 4215–4234.
- Latuasan, H. E. and W. Berends. 1961. On the origin of the toxicity of toxoflavin. Biochem. Biophys. Acta 52: 502-508.
- Laursen, J. B. and J. Nielsen. 2004. Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* 104: 1663-1686.
- 104. Lee, C.-H., J.-W. Suh, and Y.-H. Cho. 1999. Immunosuppressive activity of cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 672-674.
- 105. Lee, C.-H., H.-J. Kempf, Y. Lim, and Y.-H. Cho. 2000. Biocontrol activity of *Pseudomonas cepacia* AF2001 and anthelmintic activity of its novel metabolite, Cepacidine A. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 568–571.
- 106. Lee, C. H., S. Kim, B. Hyun, J. W. Suh, C. Yon, C. Kim, Y. Lim, and C. Kim. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 47: 1402–1405.
- 107. Lee, M. A. and Y. Liu. 2000. Sequencing and characterization of a novel serine metalloprotease from *Burkholderia* pseudomallei. FEMS Microbiol. Lett. 192: 67-72.

- Lewenza, S., B. Conway, E. P. Greenberg, and P. A. Sokol. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI homologs CepRI. *J. Bacteriol.* 181: 748–756.
- Lewenza, S. and P. A. Sokol. 2001. Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. J. Bacteriol. 183: 2212–2218.
- Li, W., D. P. Roberts, P. D. Dery, S. L. F. Meyer, S. Lohrke, R. D. Lumsden, and K. P. Hebbar. 2002. Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Prot.* J. 21: 129–135.
- 111. Lim, Y. W., K. S. Baik, S. K. Han, S. B. Kim, and K. S. Bae. 2003. Burkholderia sordidicola sp. nov., isolated from the white-rot fungus Phanerochaete sordida. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1631–1636.
- 112. Liu, X., M. Bimerew, Y. Ma, H. Muller, M. Ovadis, L. Eberl, G. Berg, and L. Chernin. 2007. Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of Serratia plymuthica. FEMS Microbiol. Lett. 270: 299-305.
- 113. Lonon, M. K., D. E. Woods, and D. C. Straus. 1988. Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. 26: 979–984.
- Lonon, M. K., D. E. Woods, and D. C. Straus. 1992. The effects of purified 25-kDa lipase from a clinical isolate of *Pseudomonas cepacia* in the lungs of rats. *Curr. Microbiol.* 25: 89-93.
- Loprasert, S., R. Sallabhan, W. Whangsuk, and S. Mongkolsuk. 2000. Characterization and mutagenesis of fur gene from Burkholderia pseudomallei. Gene 254: 129– 137.
- Lowe, C. A., A. H. Asghar, G. Shalom, J. G. Shaw, and M. S. Thomas. 2001. The *Burkholderia cepacia fur* gene: Colocalization with *omlA* and absence of regulation by iron. *Microbiology* 147: 1303–1314.
- Lutter, E., S. Lewenza, J. J. Dennis, M. B. Visser, and P. A. Sokol. 2001. Distribution of quorum-sensing genes in the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect. Immun.* 69: 4661–4666.
- Ma, W., D. M. Penrose, and B. R. Glick. 2002. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Can. J. Microbiol.* 11: 947–954.
- Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, and P. Vandamme.
 Burkholderia cepacia complex infection in patients with cystic fibrosis. J. Med. Microbiol. 51: 533-538.
- Malott, R. J., A. Baldwin, E. Mahenthiralingam, and P. A. Sokol. 2005. Characterization of the cciIR quorum-sensing system in Burkholderia cenocepacia. Infect. Immun. 73: 4982–4992.
- 121. Mao, S., S. J. Lee, H. Hwangbo, Y. W. Kim, K. H. Park, G. S. Cha, R. D. Park, and K. Y. Kim. 2006. Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Curr. Microbiol.* 53: 358–364
- 122. Marchetti, P., M. Castedo, S. A. Susin, N. Zamzami, T. Hirsch, A. Macho, A. Haeffner, F. Hirsch, M. Geuskens,

- and G. Kroemer. 1996. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis *J. Exp. Med.* **184:** 1155–1160.
- 123. Massa, C., G. Degrassi, G. Devescovi, V. Venturi, and D. Lamba. 2007. Isolation, heterologous expression and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia*. Protein Expr. Purif. 54: 300–308.
- 124. Matsuda, 1. and Z. Sato. 1988. Regulation between pathogenicity and pigment productivity in the causal agent of bacterial grain rot of rice. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 54: 378.
- 125. McCulloch, L. 1921. A bacterial disease of gladiolus. *Science* 54: 115–116.
- 126. McKenney, D., K. E. Brown, and D. G. Allison. 1995. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: Evidence of interspecies communication. *J. Bacteriol*. 177: 6989–6992.
- McKevitt, A. I., S. Bajaksouzian, J. D. Klinger, and D. E. Woods. 1989. Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun.* 57: 771-778.
- 128. Meyer, J. M., D. Hohnadel, and F. Halle. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1479–1487.
- 129. Meyer, J. M., V. T. Van, A. Stintzi, O. Berge, and G. Winkelmann. 1995. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). *Biometals* 8: 309–317.
- Miche, L., D. Faure, M. Blot, E. Cabanne-Giuli, and J. Balandreau. 2001. Detection and activity of insertion sequences in environmental strains of *Burkholderia*. *Environ*. *Microbiol*. 3: 766–773.
- 131. Mitchell, R. E., E. J. Frey, and M. K. Benn. 1986. Rhizobitoxine and 1-threohydroxythreonine production by the plant pathogen *Pseudomonas andropogonis*. *Phytochemistry* 25: 2711–2715.
- 132. Moon, S.-S., P. M. Kang, K. S. Park, and C. H. Kim. 1996. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry* 42: 365–368.
- 133. Morita, Y., E. Matsumura, T. Okabe, M. Shibata, M. Sugiura, T. Ohe, H. Tsujibo, N. Ishida, and Y. Inamori. 2003. Biological activity of tropolone. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1487–1490.
- Muir, R. M., T. Fujita, and C. Hansch. 1967. Structureactivity relationships in the auxin activity of mono-substituted phenylacetic acids. *Plant Physiol.* 42: 1519–1526.
- 135. Nagamatsu, T. 2001. Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: Toxoflavin, fervenulin, reumycin and their analogs. *Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem.* 4: 97–121.
- 136. Nair, B. M., K. J. Cheung Jr., A. Griffith, and J. L. Burns. 2004. Salicylate induces an antibiotic efflux pump in Burkholderia cepacia complex genomovar III (B. cenocepacia). J. Clin. Invest. 113: 464–473.

- Nakazawa, T., Y. Yamada, and M. Ishibashi. 1987.
 Characterization of hemolysin in extracellular products of Pseudomonas cepacia. J. Clin. Microbiol. 25: 195–198.
- 138. Nierman, W. C., D. DeShazer, H. S. Kim, H. Tettelin, K. E. Nelson, T. Feldblyum, R. L. Ulrich, C. M. Ronning, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, T. D. Davidsen, R. T. Deboy, G. Dimitrov, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, H. Khouri, J. F. Kolonay, R. Madupu, Y. Mohammoud, W. C. Nelson, D. Radune, C. M. Romero, S. Sarria, J. Selengut, C. Shamblin, S. A. Sullivan, O. White, Y. Yu, N. Zafar, L. Zhou, and C. M. Fraser. 2004. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14246–14251.
- 139. Ogawa, K., N. Yoshida, K. Kariya, C. Ohnishi, and R. Ikeda. 2002. Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinus edodes*, *Shiitake* mushroom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 25-33.
- 140. Oka, M., Y. Nishiyama, S. Ohta, H. Kamei, M. Konishi, T. Miyaki, T. Oki, and H. Kawaguchi. 1988. Glidobactins A, B and C, new antitumor antibiotics. 1. Production, isolation, chemical properties and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 41: 1331–1337.
- 141. Okazaki, S., N. Nukui, M. Sugawara, and K. Minamisawa. 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environ.* 19: 99–111.
- Ostroff, R. M., A. I. Vasil, and M. L. Vasil. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 172: 5915–5923
- 143. Ovadis, M., X. Liu, S. Gavriel, Z. Ismailov, I. Chet, and L. Chernin. 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: Cloning, sequencing, and functional studies. *J. Bacteriol.* 186: 4986–4993.
- 144. Pandey, P., S. C. Kang, and D. K. Maheshwari. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr. Sci.* 89: 177–180.
- 145. Parker, W. L., M. L. Rathnum, V. Seiner, W. H. Trejo, P. A. Principe, and R. B. Sykes. 1984. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 37: 431–440.
- Partida-Martinez, L. P. and C. Hertweck. 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437: 884–888.
- 147. Partida-Martinez, L. P., C. F. de Looss, K. Ishida, M. Ishida, M. Roth, K. Buder, and C. Hertweck. 2007. Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 793-797.
- 148. Partida-Martinez, L. P. and C. Hertweck. 2007. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "Burkholderia rhizoxina", the bacterial endosymbiont of the fungus Rhizopus microsporus. Chembiochem 8: 41–45.
- 149. Perin, L., L. Martinez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, J. I. Baldani, P. Estrada-de Los Santos, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. 2006. Burkholderia silvatlantica sp.

- nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56:** 1931–1937.
- 150. Quan, C. S., W. Zheng, Q. Liu, Y. Ohta, and S. D. Fan. 2006. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia* cepacia with strong antifungal activity against *Rhizoctonia* solani. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 1276–1284.
- Rabea, E. I., M. E. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4: 1457-1465.
- 152. Rainbow, L., C. A. Hart, and C. Winstanley. 2002. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia* pseudomallei, B. thailandensis and B. mallei. J. Med. Microbiol. 51: 374–384.
- 153. Rainbow, L., M. C. Wilkinson, P. J. Sargent, C. A. Hart, and C. Winstanley. 2004. Identification and expression of a Burkholderia pseudomallei collagenase in Escherichia coli. Curr. Microbiol. 48: 300–304.
- 154. Rasolomampianina, R., X. Bailly, R. Fetiarison, R. Rabevohitra, G. Bena, L. Ramaroson, M. Raherimandimby, L. Moulin, P. De Lajudie, B. Dreyfus, and J. C. Avarre. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14: 4135–4146.
- Ratledge, C. and L. G. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54: 881–941.
- 156. Reading, N. C. and V. Sperandio. 2006. Quorum sensing: The many languages of bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 254: 1-11.
- 157. Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V. L. D. Baldani, M. Schmid, J. I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann, and J. Caballero-Mellado. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2155–2162.
- 158. Rosenau, F. and K. Jaeger. 2000. Bacterial lipases from Pseudomonas: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. Biochimie 82: 1023–1032.
- 159. Ross, J. P., S. M. Holland, V. J. Gill, E. S. DeCarlo, and J. I. Gallin. 1995. Severe *Burkholderia (Pseudomonas) gladioli* infection in chronic granulomatous disease: Report of two successfully treated cases. *Clin. Infect. Dis.* 21: 1291–1293.
- Rotz, L. D., A. S. Khan, S. R. Lillibridge, S. M. Ostroff, and J. M. Hughes. 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 225–230.
- 161. Schellenberg, B., L. Bigler, and R. Dudler. 2007. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. *Environ. Microbiol.* 9: 1640–1650.
- Scherlach, K., L. P. Partida-Martinez, H. M. Dahse, and C. Hertweck. 2006. Antimitotic rhizoxin derivatives from a cultured bacterial endosymbiont of the rice pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. J. Am. Chem. Soc. 128: 11529-11536.
- 163. Sessitsch, A., T. Coenye, A. V. Sturz, P. Vandamme, E. A. Barka, J. F. Salles, J. D. Van Elsas, D. Faure, B.

- Reiter, B. R. Glick, G. Wang-Pruski, and J. Nowak. 2005. Burkholderia phytofirmans sp. nov., a novel plantassociated bacterium with plant-beneficial properties. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1187–1192.
- Sexton, M. M., A. L. Jones, W. Chaowagul, and D. E. Woods. 1994. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. Can. J. Microbiol. 40: 903-910.
- 165. Shimosaka, M., M. Nogawa, X. Wang, M. Kumehara, and M. Okazaki. 1995. Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 438–442.
- 166. Shimosaka, M., Y. Fukumori, X. Y. Zhang, N. J. He, R. Kodaira, and M. Okazaki. 2000. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 354–360.
- 167. Shoji, J., H. Hinoo, T. Kato, T. Hattori, K. Hirooka, K. Tawara, O. Shiratori, and Y. Terui. 1990. Isolation of cepafungins I, II and III from *Pseudomonas species*. J. Antibiot. (Tokyo) 43: 783-787.
- Soberon-Chavez, G, F. Lepine, and E. Deziel. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 718-725.
- Sokol, P. A. 1986. Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. 23: 560-562.
- Sokol, P. A., C. J. Lewis, and J. J. Dennis. 1992. Isolation of a novel siderophore from *Pseudomonas cepacia*. *J. Med. Microbiol.* 36: 184–189.
- 171. Sokol, P. A., P. Darling, D. E. Woods, E. Mahenthiralingam, and C. Kooi. 1999. Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: Characterization of *pvdA*, the gene encoding 1.-ornithine N(5)-oxygenase. *Infect. Immun.* 67: 4443–4455.
- 172. Sokol, P. A., U. Sajjan, M. B. Visser, S. Gingues, J. Forstner, and C. Kooi. 2003. The Cep1R quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 149: 3649–3658.
- 173. Solis, R., I. Bertani, G. Degrassi, G. Devescovi, and V. Venturi. 2006. Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by *Burkholderia plantarii*. FEMS Microbiol. Lett. 259: 106-112.
- 174. Song, Y., C. Xie, Y. M. Ong, Y. H. Gan, and K. L. Chua. 2005. The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia* pseudomallei. J. Bacteriol. 187: 785–790.
- 175. Songer, J. G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5: 156–161.
- 176. Stephan, H., S. Freund, W. Beck, G. Jung, J. M. Meyer, and G. Winkelmann. 1993. Ornibactins a new family of siderophores from *Pseudomonas. Biometals* 6: 93–100.
- 177. Stevens, M. P., M. W. Wood, L. A. Taylor, P. Monaghan, P. Hawes, P. W. Jones, T. S. Wallis, and E. E. Galyov. 2002. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Mol. Microbiol.* 46: 649–659.
- Stevens, M. P., A. Friebel, L. A. Taylor, M. W. Wood,
 P. J. Brown, W. D. Hardt, and E. E. Galyov. 2003. A

- Burkholderia pseudomallei type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *J. Bacteriol.* **185:** 4992–4996.
- 179. Stevens, M. P., A. Haque, T. Atkins, J. Hill, M. W. Wood, A. Easton, M. Nelson, C. Underwood-Fowler, R. W. Titball, G. J. Bancroft, and E. E. Galyov. 2004. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis. *Microbiology* 150: 2669–2676.
- 180. Stevens, M. P., J. M. Stevens, R. L. Jeng, L. A. Taylor, M. W. Wood, P. Hawes, P. Monaghan, M. D. Welch, and E. E. Galyov. 2005. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Microbiol.* 56: 40-53.
- 181. Subsin, B., C. E. Chambers, M. B. Visser, and P. A. Sokol. 2007. Identification of genes regulated by the *cepIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia* by high-throughput screening of a random promoter library. *J. Bacteriol.* 189: 968–979.
- 182. Suzuki, F., Y. Zhu, H. Sawada, and I. Matsuda. 1998. Identification of proteins involved in toxin production by Pseudomonas glumae. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 64: 75– 79.
- 183. Takahashi, M., S. Iwasaki, H. Kobayashi, S. Okuda, T. Murai, Y. Sato, T. Haraguchi-Hiraoka, and H. Nagano. 1987. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. XI. Antimitotic and anti-tubulin activity of new antitumor antibiotics, rhizoxin and its homologues. J. Antibiot. (Tokyo) 40: 66-72.
- 184. Takeda, Y., R. Aono, and N. Doukyu. 2006. Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant Burkholderia cepacia strain ST-200. Extremophiles 10: 269-277.
- 185. Tawara, S., S. Matsumoto, T. Hirose, Y. Matsumoto, S. Nakamoto, M. Mitsuno, and T. Kamimura. 1989. *In vitro* antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. *Jpn J. Med. Mycol.* 30: 202–210.
- Thomas, M. S. 2007. Iron acquisition mechanisms of the Burkholderia cepacia complex. Biometals 20: 431–452.
- 187. Tolcher, A. W., C. Aylesworth, J. Rizzo, E. Izbicka, E. Campbell, J. Kuhn, G. Weiss, D. D. Von Hoff, and E. K. Rowinsky. 2000. A phase I study of rhizoxin (NSC 332598) by 72-h continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *Ann. Oncol.* 11: 333–338.
- 188. Trân Van, V., O. Berge, S. Ngo Ke, J. Balandreau, and T. Heulin. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218: 273–284.
- Trust, T. J. 1975. Antibacterial activity of tropolone. Antimicrob. Agents Chemother. 7: 500-506.
- 190. Tsuruo, T., T. Oh-hara, H. Iida, S. Tsukagoshi, Z. Sato, I. Matsuda, S. Iwasaki, S. Okuda, F. Shimizu, K. Sasagawa, M. Fukami, K. Fukuda, and M. Arakawa. 1986. Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines. Cancer Res. 46: 381-385.

- 191. Tuanyok, A., M. Tom, J. Dunbar, and D. E. Woods. 2006. Genome-wide expression analysis of *Burkholderia* pseudomallei infection in a hamster model of acute melioidosis. *Infect. Immun.* 74: 5465–5476.
- 192. Ulrich, R. L., D. Deshazer, E. E. Brueggemann, H. B. Hines, P. C. Oyston, and J. A. Jeddeloh. 2004. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia* pseudomallei. J. Med. Microbiol. 53: 1053-1064.
- Ulrich, R. L., D. Deshazer, H. B. Hines, and J. A. Jeddeloh. 2004. Quorum sensing: A transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun.* 72: 6589-6596.
- 194. Ulrich, R. L., H. B. Hines, N. Parthasarathy, and J. A. Jeddeloh. 2004. Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *J. Bacteriol.* 186: 4350–4360.
- 195. Upadhyay, A., C. Williams, A. C. Gill, D. L. Philippe, K. Davis, L. A. Taylor, M. P. Stevens, E. E. Galyov, and S. Bagby. 2004. Biophysical characterization of the catalytic domain of guanine nucleotide exchange factor BopE from Burkholderia pseudomallei. Biochim. Biophys. Acta 1698: 111-119
- 196. Ura, H., N. Furuya, K. Iiyama, M. Hidaka, K. Tsuchiya, and N. Matsuyama. 2006. Burkholderia gladioli associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. J. Gen. Plant Pathol. 72: 98-103.
- 197. Urakami, T., C. Ito-Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K.-I. Suzuki, and K. Komagata. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 235–245.
- 198. Valade, E., F. M. Thibault, Y. P. Gauthier, M. Palencia, M. Y. Popoff, and D. R. Vidal. 2004. The PmII-PmIR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J. Bacteriol.* 186: 2288–2294.
- 199. Valverde, A., P. Delvasto, A. Peix, E. Velazquez, I. Santa-Regina, A. Ballester, C. Rodriguez-Barrueco, C. Garcia-Balboa, and J. M. Igual. 2006. Burkholderia ferrariae sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2421–2425.
- 200. Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters, and J. R. Govan. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1188–1200.
- Vandamme, P., E. Mahenthiralingam, B. Holmes, T. Coenye, B. Hoste, P. De Vos, D. Henry, and D. P. Speert. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia* stabilis sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin. Microbiol. 38: 1042–1047.
- 202. Vandamme, P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, and A. Willems. 2002. Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 25: 507-512.
- Vandamme, P., D. Henry, T. Coenye, S. Nzula, M. Vancanneyt, J. J. LiPuma, D. P. Speert, J. R. Govan, and E.

- Mahenthiralingam. 2002. Burkholderia anthina sp. nov. and Burkholderia pyrrocinia, two additional Burkholderia cepacia complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 33: 143–149.
- Vasil, M. L., D. P. Krieg, J. S. Kuhns, J. W. Ogle, V. D. Shortridge, R. M. Ostroff, and A. I. Vasil. 1990. Molecular analysis of hemolytic and phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun*. 58: 4020–4029.
- Vermis, K., T. Coenye, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, H. J. Nelis, and P. Vandamme. 2004. Proposal to accommodate Burkholderia cepacia genomovar VI as Burkholderia dolosa sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 689–691.
- 206. Viallard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Ophel-Keller, and J. Balandreau. 1998. Burkholderia graminis sp. nov., a rhizospheric Burkholderia species, and reassessment of [Pseudomonas] phenazinium, [Pseudomonas] pyrrocinia and [Pseudomonas] glathei as Burkholderia. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 549–563.
- Visca, P., A. Ciervo, V. Sanfilippo, and N. Orsi. 1993. Ironregulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1995–2001.
- Visca, P., A. Ciervo, and N. Orsi. 1994. Cloning and nucleotide sequence of the pvdA gene encoding the pyoverdin biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 176: 1128–1140.
- Visser, M. B., S. Majumdar, E. Hani, and P. A. Sokol. 2004.
 Importance of the ornibactin and pyochelin siderophore transport systems in *Burkholderia cenocepacia* lung infections. *Infect. Immun.* 72: 2850–2857.
- Ward, O. P. and M. Moo-Young. 1989. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8: 237–274.
- Weinberg, E. D. 1978. Iron and infection. *Microbiol. Rev.* 42: 45–66.
- Weingart, C. L. and A. M. Hooke. 1999. Regulation of expression of the nonhemolytic phospholipase C of Burkholderia cepacia. Curr. Microbiol. 39: 336–341.
- Weingart, C. L. and A. M. Hooke. 1999. A nonhemolytic phospholipase C from *Burkholderia cepacia*. *Curr. Microbiol*. 38: 233–238.
- 214. Wheatley, R. E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 357–364.
- Wigley, P. and N. F. Burton. 2000. Multiple chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *B. gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia. J. Appl. Microbiol.* 88: 914–918.
- Wilsher, M. L., J. Kolbe, A. J. Morris, and D. F. Welch. 1997. Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 1436–1440.
- Wilson, T., C. J. Rabie, J. E. Fincham, P. S. Steyn, and M. A. Schipper. 1984. Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals. *Food Chem. Toxicol.* 22: 275–281.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of

- Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36: 1251–1275.
- 219. Yang, H., C. D. Kooi, and P. A. Sokol. 1993. Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. *Infect. Immum.* 61: 656-662.
- 220. Yang, H. C., W. T. Im, K. K. Kim, D. S. An, and S. T. Lee. 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 453–457.
- 221. Yasuta, T., S. Okazaki, H. Mitsui, K.-l. Yuhashi, H. Ezura, and K. Minamisawa. 2001. DNA sequence and mutational analysis of rhizobitoxine biosynthesis genes in *Bradyrhizobium elkanii*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4999–5009.
- 222. Yilmaz, E. 2004. Chitosan: A versatile biomaterial. Adv. Exp. Med. Biol. 553: 59-68.
- 223. Ying, J., T. Yoshihara, A. Ichihara, S. Ishikuri, and H. Uchino. 1996. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Lett.* 37: 1039-1042.
- 224. Yoo, S. H., B. Y. Kim, H. Y. Weon, S. W. Kwon, S. J. Go, and E. Stackebrandt. 2007. *Burkholderia soli* sp. nov.,

- isolated from soil cultivated with Korean ginseng. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 122-127.
- 225. Yuhashi, K., N. Ichikawa, H. Ezura, S. Akao, Y. Minakawa, N. Nukui, T. Yasuta, and K. Minamisawa. 2000. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2658–2663.
- Zazimalova, E. and R. M. Napier. 2003. Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Rep.* 21: 625-634.
- 227. Zhang, H., S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 2000. Burkholderia kururiensis sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 743-749.
- 228. Zhao, N., C. Qu, E. Wang, and W. Chen. 1995. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al., 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al., 1960) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 600–603.
- 229. Zhou, H., F. Yao, D. P. Roberts, and T. G. Lessie. 2003. AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. *Curr. Microbiol.* 47: 174-179.

Lépine, F., <u>Dekimpe, V</u>., Lesic, B., Milot, S., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rahme, L. G. & Deziel, E. (2007).

PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by *Pseudomonas* aeruginosa and *Burkholderia thailandensis*. *Biol Chem* 388, 839-845.

Contribution : J'ai réalisé la majorité des analyses microbiologiques publiées dans l'article.

PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*

François Lépine^{1,*}, Valérie Dekimpe¹, Biliana Lesic², Sylvain Milot¹, Alain Lesimple³, Orval A. Mamer³, Laurence G. Rahme² and Eric Déziel¹

- ¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval H7V 1B7, Québec, Canada
- ² Department of Surgery, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, and Shriner's Burns Institute, Boston, MA 02114, USA
- ³ McGill Biomedical Mass Spectrometry Unit, McGill University, Montreal H3A 1A4, Quebec, Canada
- *Corresponding author e-mail: francois.lepine@iaf.inrs.ca

Abstract

A new metabolite, 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), was identified in cultures of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*. We found that the biosynthesis of DHQ correlates with the presence of a functional PqsA, which is a product of the *pqsABCDE* operon responsible for the synthesis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) in *P. aeruginosa*. However, DHQ is not a degradation product or precursor of HAQs. This finding sheds some light on the poorly understood biosynthesis pathway of HAQs, which includes important communication signals regulating the expression of virulence factors.

Keywords: 2,4-dihydroxyquinoline; 4-hydroxy-2-alkylquinolines; mass spectrometry; natural product; *Pseudomonas aeruginosa*; PqsA.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous and versatile Gram-negative opportunistic bacterial pathogen primarily infecting immunocompromised individuals and those suffering from cystic fibrosis (Lyczak et al., 2000). P. aeruginosa produces a large number of extracellular products, many of which are virulence factors (Kipnis et al., 2006). The regulation of many of these virulence factors is controlled in a cell density-dependent manner through a process called quorum sensing (QS) (Rumbaugh et al., 2000; Juhas et al., 2005), an intercellular communication system used by many bacterial species to regulate the expression of a wide variety of survival and virulence mechanisms in response to cell density (Fuqua et al., 2001).

We have discovered a unique regulatory and signalling mechanism required for the full virulence of P. aeruginosa. This newly identified intercellular communication system is based on the production of a group of extracellular 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) (Déziel et al., 2004; Lépine et al., 2004). These include the intercellular signalling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) (Déziel et al., 2004) and its hydroxylated derivative 3,4dihydroxy-2-heptylquinoline, also known as the Pseudomonas quinolone signal (PQS), involved in the QS regulatory system (Pesci et al., 1999; McKnight et al., 2000; Diggle et al., 2003). HAQs are primarily synthesised through the activity of enzymes encoded by the pqs-ABCDE and phnAB operons, both controlled by the MvfR transcriptional regulator (Cao et al., 2001; Gallagher et al., 2002; Déziel et al., 2004). HHQ and PQS have recently been revealed as inducers of MvfR (Wade et al., 2005; Xiao et al., 2006a). The production of a number of virulence factors and secondary metabolites known to be under the influence of the QS regulatory circuitry is reduced in an mvfR mutant (Cao et al., 2001; Gallagher et al., 2002; Diggle et al., 2003; Déziel et al., 2005).

Anthranilic acid (AA) is the precursor of all HAQs (Déziel et al., 2004) and PhnAB is primarily responsible for its synthesis (Calfee et al., 2001; Déziel et al., 2004). However, little is known about the exact role of the individual genes in the pqsABCDE operon. While, according to the P. aeruginosa genome annotation (www.pseudomonas.com), pqsBCD is related to 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases and would then be involved in synthesis of the 3-keto fatty acid moiety (Gallagher et al., 2002; Bredenbruch et al., 2005), PqsE is not required for the synthesis of HAQs (Gallagher et al., 2002; Déziel et al., 2004). PqsA displays similarity with coenzyme A ligases, and more specifically with many enzymes that activate aromatic acids such as benzoate and 4-hydroxybenzoate, an indication that it might be involved in activation of the carbonyl of AA in the synthesis of HAQs. We report here that PqsA is also involved in the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), an extracellular metabolite that has not been described so

Results

Identification and quantification of DHQ by LC/MS

During LC/MS analysis of *P. aeruginosa* PA14 cultures supplemented with AA-d₄, we noted, along with the expected labelling of HAQs, another ion presenting an additional 4-Da increase compared to the same culture

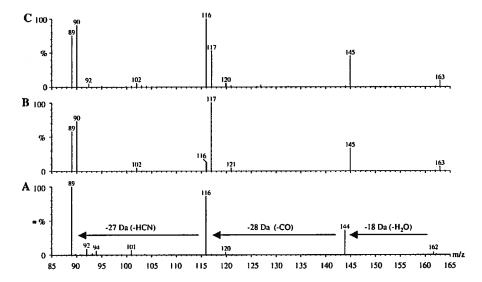


Figure 1 Mass spectra of DHQ. (A) MS/MS spectrum of the m/z 162 ion of DHQ observed in a PA14 culture. (B) MS/MS spectrum of the m/z 163 ion corresponding to DHQ in a PA14 culture fed α °C-labelled AA. (C) MS/MS spectrum of the m/z 163 ion of DHQ in a culture fed 1000 mg/l acetic acid-2-1°C.

with unlabelled AA. This ion exhibits a pseudomolecular ion [M+H]⁺ at *m/z* 162 and corresponds to a compound derived from AA that cannot be extracted from the culture medium, even after multiple extractions with ethyl acetate, an indication that it is very polar.

Its MS/MS spectrum shows the loss of 18 Da (loss of water) from the [M+H]+ ion (Figure 1A), to produce an ion at m/z 144. This ion further fragments with the loss of 28 Da (CO) to yield an ion at m/z 116, which then produces an ion at m/z 89 after the loss of 27 Da (HCN). The precursor molecule incorporates the aromatic ring of AA and likely contains the nitrogen of AA as well, considering the odd molecular weight of the molecule. Exact mass measurement of the m/z 162 ion using a Fouriertransform mass spectrometer (FT-MS) gave a value of 162.0548, which corresponds to an elemental composition of C₉H₈NO₂. These observations are compatible with the structure of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ) (Figure 2). This was confirmed using authentic DHQ, which presents the same retention time and the same MS/MS spectrum (data not shown). The fragmentation sequence presented above was confirmed by FT-MS using sustained off-resonance irradiation (SORI). Using exact mass measurement, we confirmed that the ion at m/z 144.0444 (C_oH_eNO) fragments to produce only one ion at m/z

Figure 2 Putative intermediates in the formation of DHQ corresponding to the addition of an acetate moiety onto AA.

116.0494 (C_0H_0N), thus proving that the 28-Da loss observed in MS/MS corresponds to the loss of CO.

Using a calibration curve of commercial DHQ, the rate of DHQ production in a PA14 culture was measured (Figure 3), which clearly indicates that DHQ production is initiated at the end of the logarithmic growth phase, like HHQ, the precursor of PQS. Under the specified growth conditions, DHQ production peaks at 26.9 ± 0.96 mg/l at an OD₆₀₀ of 5.8. Production by *P. aeruginosa* strain PAO1 is similar, while strain PAK does not produce any detectable DHQ. We have previously shown that the latter strain does not produce HAQs (Lépine et al., 2003). DHQ was also found in cultures of *Bulkholderia thailandansis* strain E264, but at a much lower concentration (0.26 \pm 0.26 mg/l at an OD₆₀₀ of 7.5).

Genes involved in DHQ production

Feeding HHQ-d₄ or PQS-d₄ to a PA14 culture did not lead to labelling of DHQ, proving that DHQ is not a degradation product of these HAQs. The fact that AA is a precursor of both HAQs and DHQ, along with their structural similarities, prompted us to investigate whether enzymes required for the synthesis of HAQs could also be involved in the synthesis of DHQ. DHQ production by various PA14 mutants for the pqsABCDE genes was therefore investigated. While pgsA, pgsB, pgsC and pgsD are all essential for HAQ production (Gallagher et al., 2002; Déziel et al., 2004), we found that only the pqsA mutant does not produce DHQ. As expected, complementation of the pqsA- mutant with pLG14, a plasmid carrying pgsABC, restored the production of DHQ (0.20±0.022 mg/l). The pqsB- mutant, in which only pqsA is transcribed, produced 0.50±0.036 mg/l of DHQ, supporting the model in which PqsA is involved in the conversion of AA into DHQ. Importantly, the DHQ concentration increased to 1.2±0.066 mg/l when PQS was added to a pqsB- culture, showing that the enzyme sys-

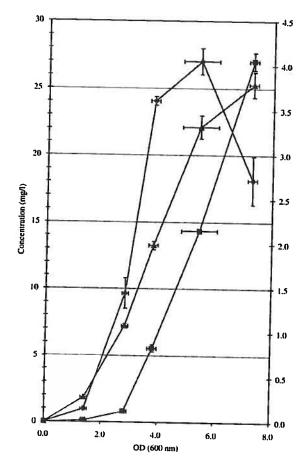


Figure 3 Production of DHQ (♦), PQS (■) (left axis) and HHQ (▲) (right axis) in a growing culture of P. aeruginosa strain PA14. Results represent the average of triplicates.

tem responsible for DHQ production is controlled by MvfR, for which PQS acts as an activator.

To support this genetic evidence pointing towards PqsA as an enzyme responsible for DHQ synthesis, 6fluoroanthranilic acid (6-FABA), an inhibitor of PqsA activity, was fed to the bacteria. 6-FABA inhibits HAQ synthesis without affecting bacterial growth (Lesic et al., submitted for publication). Because of its structural analogy with AA, we believe that 6-FABA competitively hinders PqsA function by occupying its active site. Addition of 1.5 mм 6-FABA completely prevented DHQ production in strain PA14. In agreement with the presumed mode of action of this inhibitor, supplementation with 3 mm AA to a medium containing 1.5 mм 6-FABA partially restored DHQ production (1.97±0.14 mg/l), another indication that HAQs and DHQ share a common enzymatic pathway through PasA.

Biosynthesis of DHQ

The DHQ biosynthetic pathway was then investigated. Knowing that the aromatic ring of AA is incorporated into DHQ, as shown above with $AA-d_4$, we investigated whether the carbon of the carbonyl group is also conserved. A PA14 culture was fed 100 mg/l α^{13} C-labelled AA. The observed m/z 163 peak displayed 101.6% of the

intensity of the peak at m/z 162, while the natural 13C abundance in DHQ yields a normal intensity of 10.5%. Therefore the ratio of labelled to unlabelled DHQ was 83.1%. When 100 mg/l AA-d4 was fed to the bacteria, the ratio of labelled to unlabelled DHQ was 80.6%. This shows that the α -carbon of AA is incorporated to the same extent as the aromatic moiety of AA and that all the carbons of AA are incorporated into DHQ.

This leaves two carbon atoms unaccounted for in the biosynthesis of DHQ. To verify if these two carbons originate from the direct addition of acetate onto AA, PA14 cultures were supplemented with 1000 mg/l sodium acetate-2-13C. The resulting m/z 163 peak had 35% of the intensity of that at m/z 162 (data not shown), and thus a labelled to unlabelled DHQ ratio of 24.5%. This indicates that at least one carbon from exogenously supplied acetate is incorporated into DHQ.

Two plausible DHQ precursors that include AA and an acetate moiety can therefore readily be envisioned: Nacetyl-AA and 3-(2'-aminophenyl)-3-ketopropanoic acid (Figure 2). The first would be the N-acetylation product of AA, which could undergo cyclisation of the methyl group with an activated carbonyl of AA. The second could be the result of coupling of the methyl group of acetate onto the activated carbonyl of AA, followed by cyclisation of the acetyl carbonyl and the amine of AA. In both cases, direct incorporation of 2-13C acetic acid would result in labelling at the 3-position of DHQ.

To determine the position of the label in DHQ when the bacteria were fed sodium acetate-2-13C, it was necessary to determine whether the loss of CO originates from the 2- or the 4-position of DHQ. Thus, the m/z 163 ion arising from the $\alpha^{\scriptscriptstyle 13}\text{C}$ enriched AA feeding experiment was analysed by MS/MS (Figure 1B). The m/z 163 ion showed the same initial loss of water to produce the m/z 145 ion, which then mainly lost 28 Da to produce the m/z 117 ion. In this experiment, the ¹³C label can only be in the 4position, and because a loss of 29 Da was not observed, it can be deduced that the carbon in the 4-position cannot be the one involved in the loss of CO. Thus, the loss of CO originates from the other carbon bearing an oxygen at position 2. This also shows that the oxygen involved in the initial loss of water must originate from the 4-position.

We were also interested in identifying the second proton involved in the initial loss of water (Figure 4). This

Figure 4 Representation of the tautomeric forms of the pseudomolecular ion of DHQ.

could be either one of the easily exchangeable protons on the nitrogen or hydroxyl, or the aromatic proton adjacent to the hydroxyl groups. Deuterium exchange was carried out to label the three easily exchangeable protons located on the nitrogen or the hydroxyl groups, and MS/ MS analysis of the [M+H]+ ion was performed to determine whether the molecule loses 19 or 20 Da. After 1 h at room temperature in D2O containing 1% acetic acidd, we obtained an increase of 4 Da instead of exchanging only three protons. This fourth proton is likely the aromatic proton adjacent to the two hydroxyl groups, as it is a relatively acidic proton adjacent to two carbonyls in the tautomeric form represented in Figure 4. Nevertheless, the MS/MS spectrum of the transient m/z 165 ion, which corresponds to the exchange of only three protons, shows predominantly the loss of 19 Da. This could only be due to loss of the slower exchangeable proton at position 3, adjacent to the two carbonyls (Figure 4). The exchange of four hydrogen atoms in D₂O implies that the molecule tautomerises into the diketo form to a considerable extent, as depicted in Figure 4, and that the 2carbon exists, at least transiently, as a carbonyl, which is reflected in the loss of CO from the m/z 145 ion.

When sodium acetate-2-13C was added to the cultures, the intensity observed for the m/z 163 peak was 35% of that of m/z 162, instead of the 10.5% normally expected for naturally occurring 13C. Thus, 30% of the intensity of this m/z 163 ion is due to unlabelled DHQ. The MS/MS spectrum of m/z 163 shows predominantly an m/z 116 ion corresponding to the loss of 29 Da from m/z 145 (Figure 1C). Although the m/z 117 ion observed in this spectrum is relatively abundant compared to m/z 116, it arises mostly from the 28-Da loss from naturally 13C enriched DHQ, which represents 30% of the mother m/z 163 ion and should represent 30% of m/z 116. As m/z 116 has twice the intensity of the m/z 117 ion, this implies that most of the label is at the 2-position. This is not in agreement with the scheme proposed in Figure 2, or at least it indicates that if N-acetyl-AA is indeed the precursor, it is not the direct product of addition of the exogenously added acetic acid onto AA. Adding N-acetyl-AA to a PA14 culture did not increase the amount of DHQ produced. This leaves open the possibility that 3-(2'-aminophenyl)-3-ketopropanoic acid could be a precursor of DHQ, although it cannot be formed by the direct addition of exogenously applied acetic acid onto

A series of compounds containing two carbons were tested to determine if they could be precursors of DHQ. Oxalic and glycolic acid had no effect on DHQ production, but glyoxylic acid totally inhibited DHQ. It was thought that this effect could be rationalised by inhibition of the Krebs cycle glyoxylate shunt and that the precursor could be a product of the Krebs cycle. Indeed, itaconate also inhibits DHQ production. However, fumarate and oxaloacetate have no effect.

It is still possible that exogenously supplied AA is metabolised by the bacteria and transformed into another compound that is the precursor of DHQ. As AA is a precursor of tryptophan, this amino acid was added to the culture along with other known tryptophan metabolites to determine the effect on DHQ production. The

metabolites tested were 2-aminoacetophenone, *N*-formylacetophenone, indole, skatole, kynurenic acid and indoleacetic acid. However, no increase in DHQ production was observed. Finally, 4-hydroxyquinoline was also tested to verify whether it could be the precursor of DHQ through simple hydroxylation at the 2 position, but the amount of DHQ did not increase either.

Two anthranilate synthases are present in *P. aeruginosa*: PhnAB, controlled by MvfR and the primary source of AA for HAQ synthesis, and TrpEG, which especially contributes to tryptophan synthesis (Essar et al., 1990). A *phnAB* mutant is still capable of producing HAQs and DHQ, but at lower concentration (18.9±0.69 mg/l at OD 4.5) than the wild-type strain. A double *trpE-phnAB*-mutant grown in M63 minimal medium supplemented with 1% dextrose and tryptophan or AA still produces DHQ and HAQs, confirming that a third source of AA exists through degradation of tryptophan, apparently via the kynurenine pathway (Kurnasov et al., 2003).

When 3 mm AA-d4 or α^{13} C-AA was added to cultures, DHQ and all the HAQs were almost quantitatively labelled with an additional increase of 4 and 1 Da, respectively. Quantitative labelling of 4 Da was also found for DHQ and HAQs when tryptophan-d₅ was added to the same minimal medium. Therefore, endogenous production of AA by PhnAB and TrpEG caused the incomplete labelling of DHQ and HAQs observed when the wild-type strain or phnAB mutant was cultivated with AA-d₄.

Biological activity of DHQ

Since PQS and HHQ act as inducers of the activity of MvfR (Wade et al., 2005; Xiao et al., 2006a), we investigated whether DHQ could perform a similar function by activating transcription of the pgsABCDE operon. However, DHQ had no effect on the activity of the pqsA-lacZ reporter and DHQ supplementation did not alter the production of HAQs. In addition, DHQ does not increase the production of blue phenazine pyocyanin, in contrast to PQS (Diggle et al., 2003). This behaviour is similar to the effect of the other principal HAQ produced by P. aeruginosa, HQNO (Déziel et al., 2004; Xiao et al., 2006a). Instead, the latter molecule inhibits the growth of Grampositive bacteria (Machan et al., 1992; Déziel et al., 2004; Hoffman et al., 2006). Still, DHQ did not inhibit growth of Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Vibrio harveyi, Chromobacterium violaceum, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis or Cryptococcus neoformans (data not shown).

Discussion

It is interesting to find that such a simple molecule as DHQ, which is produced at up to 26.9 mg/l (Figure 3) by the widely studied bacterium *P. aeruginosa*, has not been reported previously, perhaps because this compound is insoluble in most organic solvents, and therefore is not easily isolated by simple extraction. The fact that DHQ is produced by the two HAQ-positive *P. aeruginosa* strains PAO1 and PA14, but not by the HAQ-negative strain PAK, first shows that there is a relationship between DHQ and HAQ production. This is further highlighted by the obser-

vation that B. thailandensis strain E264, which produces some HAQ congeners as described in the B. thailandensis strain E30 (Diggle et al., 2006) and possesses a pqsABCDE homologue, also produces significant amounts of DHQ.

The fact that DHQ and HAQs share structural similarities and that they both have AA as a common precursor implies some common steps in their biosynthetic pathways. However, HAQ production requires all the genes of the pasABCD cluster, while DHQ production only needs pqsA, as it is still produced in a polar pgsBmutant, but is completely absent in a polar pgsA mutant. Complementation of a pqsA- mutant by a plasmid containing pqsA also restored DHQ production. The closing of the second aromatic ring of HAQs and DHQ with retention of the original carbonyl carbon of AA requires activation of this function. PqsA shows homologies with CoA ligases, and more specifically with CoA ligases involved in the activation of aromatic carbonyls, such as those of benzoate and 4-hydroxybenzoate. Bredenbruch et al. (2005) hypothesised that PqsA might be involved in the activation of the carbonyl of the 3-ketofatty acid precursor of HAQs. Our results rather show that PqsA is more likely involved in the activation of the carbonyl group of AA, as there is no fatty acid-derived alkyl chain in DHQ. This activation could directly occur on AA to produce an intermediate anthranilyl-CoA or occur after an eventual coupling between the AA nitrogen and the active ketone of the 3-ketofatty acid precursor (Figure 5). The involvement of an anthranilyl-CoA ester in the biosynthesis of HHQ has already been suggested (Ritter and Luckner, 1971; Gallagher et al., 2002). For DHQ, we initially hypothesised that acetate could be the source of the additional two carbons and that PqsA could be involved either in the final ring-closing reaction or in synthesis of the two putative precursors depicted in Figure 2. Feeding the bacteria with acetate-2-13C confirmed that at least one carbon from acetate is incorporated into DHQ, but detailed analysis of the various MS/MS spectra showed that exogenous acetate is not directly incorporated into AA, as the location of the label is not where it would be expected if exogenous acetate were directly incorporated into these two putative precursors. This also explains the relatively small ratio of labelled versus non-labelled compounds (24.5%) observed when acetate-2-13C was added to the culture medium, even if a very high concentration (1000 g/l) of acetate was used.

The ratio of labelled versus non-labelled compounds when AA-d₄ was added, although more considerable

than with acetate, did not exceed 1:1, despite the amount of AA-d₄ added (100 mg/l), even if we observed that all the carbon atoms of AA are incorporated into DHQ. One possibility is that the intracellular concentration of endogenous AA is much higher than the concentration added to the culture medium. This was later confirmed, as labelling was almost quantitative when the double mutant trpE-phnAB- was used. We were also able to confirm that tryptophan degradation contributes to the endogenous pool of AA using the double mutant fed labelled tryptophan, even though addition of a variety of tryptophan degradation intermediates did not lead to an increase in DHQ production. The fact that the ratio of labelled versus unlabeled compound in DHQ is the same as that observed for the HAQs in the same experiment rather indicates that it is more likely that DHQ and HAQs directly incorporate exogenous AA once diluted in the intracellular pool, rather than incorporating AA through one of its metabolites.

All these results indicate that AA is directly used by the bacteria for coupling with an as yet unidentified metabolite of acetic acid. The inhibitory effects of glyoxylate and itaconate support the hypothesis of the involvement of the Krebs cycle and/or the glyoxylate shunt in the generation of this metabolite. One of these coupling reactions involves PqsA, which acts by activating the carboxylate of AA, probably through the formation of a CoA thioester bond, as suggested by the amino acid sequence homologies of PqsA with aromatic CoA ligases. This could be observed through the inhibition of DHQ production by 6-FABA, an inhibition rescued by addition of more AA.

The precise biological role of DHQ remains to be determined. It is not involved in the regulation of MvfR activity or in the biosynthesis of HAQs and has no antimicrobial effects against a large range of microbial species.

Overall, the results of these experiments indicate that DHQ biosynthesis proceeds through the action of PqsA, an enzyme required for the biosynthesis of HAQs. The structure of DHQ strongly suggests that PqsA is involved in the activation of the carbonyl function of AA, a chemical step that is required for closing of the second aromatic ring of DHQ and HAQs. As HHQ and PQS are modulators of the activity of MvfR, which controls the expression of a large number of virulence factors, it is important to understand the initial steps of HAQ synthesis. The identification of DHQ as a metabolite produced through PqsA will help in defining the function of this enzyme.

Figure 5 Proposed pathway for the formation of DHQ and HHQ.

Materials and methods

Chemicals

3,4,5,6-Tetradeutero-AA (AA-d₄) and anthranilic-α¹³C acid were from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Sodium acetate-2-¹³C, deutero-acetic acid, DHQ, and all other chemicals were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). *N*-Formylacetophenone was synthesised according to Hoenicke et al. (2002).

Bacteria, plasmids, and culture conditions

P. aeruginosa strains PA14, PAO1, and PAK and B. thailandansis strain E264 (ATCC) were used. PA14 pqsA, pqsB and pqsD mutants were TnphoA insertional mutants (Déziel et al., 2004). pLG14, which is pUCP18 carrying pqsABC, was from Gallagher et al. (2002), and pGX5 is a pqsA-lacZ transcriptional reporter (Xiao et al., 2006b). A trpE (No. 40990) mutant was obtained from the non-redundant PA14 transposon library (Liberati et al., 2006) and used for construction of the double mutant trpEphnAB- mutant, which was generated by allelic exchange using the suicide vector pEX18Ap and sucrose counterselection as previously described (Déziel et al., 2004). Mutagenesis results in the deletion of most of phnAB and leaves 300 bp of the 5' end of phnA and 300 bp of the 3' end of phnB. The deletion was confirmed by PCR and sequencing. As expected, the double mutant trpE-phnAB was not viable in minimal medium, as it is unable to produce AA, the precursor of tryptophan. Unless otherwise stated, all bacteria were cultivated in tryptic soy broth (Difco, Sparks, MD, USA) at 37°C in a rotary shaker and samples were taken when cultures had reached an OD600 between 5.0 and 5.5. Sample preparation was performed with methanol as previously described, using 5,6,7,8-tetradeutero-PQS as the internal standard (Déziel et al., 2005). All experiments were performed in triplicate and the standard deviation is indicated.

Mass spectrometry

MS analyses were performed on a Quattro II (Waters, Mississauga, ON, Canada) triple-quadrupole mass spectrometer in positive electrospray ionisation mode. Collision-induced dissociation was performed with argon as collision gas at 2×10⁻³ mTorr. The mass spectrometer was coupled to a HP 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Saint-Laurent, QC, Canada) equipped with a 3×150 mm C8 Luna reverse-phase column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A water/acetonitrile gradient with 1% acetic acid was used as the mobile phase at a flow rate of 0.4 ml/min split to 10% through a Valco T-piece. Quantification of DHQ and other HAQs was performed in full-scan mode using PQS-d₄ as the internal standard. The elemental composition of fragment ions was determined using a 7-T FTMS instrument using SORI (Varian, Mississauga, ON, Canada).

Acknowledgements

Work in F.L.'s laboratory was funded by NSERC. Work in E.D.'s laboratory was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Work in L.G.R.'s laboratory was funded by NIH (R01Al063433) and SCH (grant #8850).

References

Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., and Häussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. J. Bacteriol. *187*, 3630–3635.

- Calfee, M.W., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 11633–11637.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., and Rahme, L.G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysRlike transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14613–14618.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhIRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol. Microbiol. 55, 998–1014.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 1339–1344.
- Diggle, S.P., Lumjiaktase, P., Dipilato, F., Winzer, K., Kunakorn, M., Barrett, D.A., Chhabra, S.R., Camara, M., and Williams, P. (2006). Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. Chem. Biol. 13, 701–710.
- Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Camara, M., and Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol. Microbiol. 50, 29–43.
- Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I.P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. J. Bacteriol. 172, 884–900.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acylhomoserine lactone quorum sensing. Annu. Rev. Genet. 35, 439–468.
- Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C., and Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184, 6472–6480.
- Hoenicke, K., Borchert, O., Gruning, K., and Simat, T.J. (2002). 'Untypical aging off-flavor' in wine: synthesis of potential degradation compounds of indole-3-acetic acid and kynurenine and their evaluation as precursors of 2-aminoacetophenone. J. Agric. Food. Chem. 50, 4303–4309.
- Hoffman, L.R., Deziel, E., D'Argenio, D.A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., and Miller, S.I. (2006). Selection for Staphylococcus aureus small-colony variants due to growth in the presence of Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 19890–19895.
- Juhas, M., Eberl, L., and Tummler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ. Microbiol. 7, 459–471.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med. Mal. Infect. 36, 78–91.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T., and Osterman, A. (2003). Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. FEMS Microbiol. Lett. 227, 219–227.
- Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., and Rahme, L.G. (2003). A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudo-monas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Biochim. Biophys. Acta 1622, 36–41.

- Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J., and Rahme, L.G. (2004). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by Pseudomonas aeruginosa. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 862-869.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., and Ausubel, F.M. (2006). An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2833-2838.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2, 1051-1060.
- Machan, Z.A., Taylor, G.W., Pitt, T.L., Cole, P.J., and Wilson, R. (1992). 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 30, 615-623.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., and Pesci, E.C. (2000). The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 182, 2702-2708.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseu-

- domonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11229-11234.
- Ritter, C. and Luckner, M. (1971). Biosynthesis of 2-n-alkyl-4hydroxyquinoline derivatives (pseudane) in Pseudomonas aeruginosa. Eur. J. Biochem. 18, 391-400.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., and Hamood, A.N. (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa. Microbes Infect. 2, 1721-1731.
- Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2005). Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 187, 4372-4380.
- Xiao, G., Deziel, E., He, J., Lepine, F., Lesic, B., Castonguay, M.H., Milot, S., Tampakaki, A.P., Stachel, S.E., and Rahme, L.G. (2006a). MvfR, a key Pseudomonas aeruginosa pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. Mol. Microbiol. 62, 1689-1699.
- Xiao, G., He, J., and Rahme, L.G. (2006b). Mutation analysis of the Pseudomonas aeruginosa mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. Microbiology 152, 1679-1686.

Received April 19, 2007; accepted May 11, 2007

		1
		į
		ŀ
		1
		ı
		1
		1
		1
		1
		ĺ
		Ì
		1
		1
		1
		*
		1

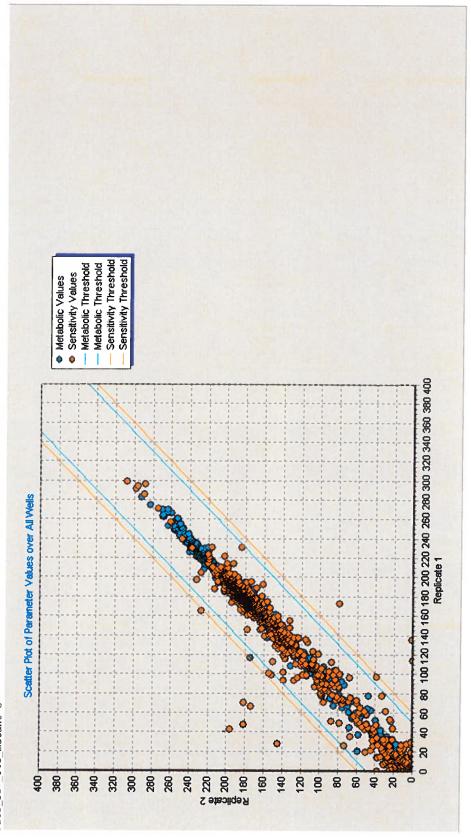


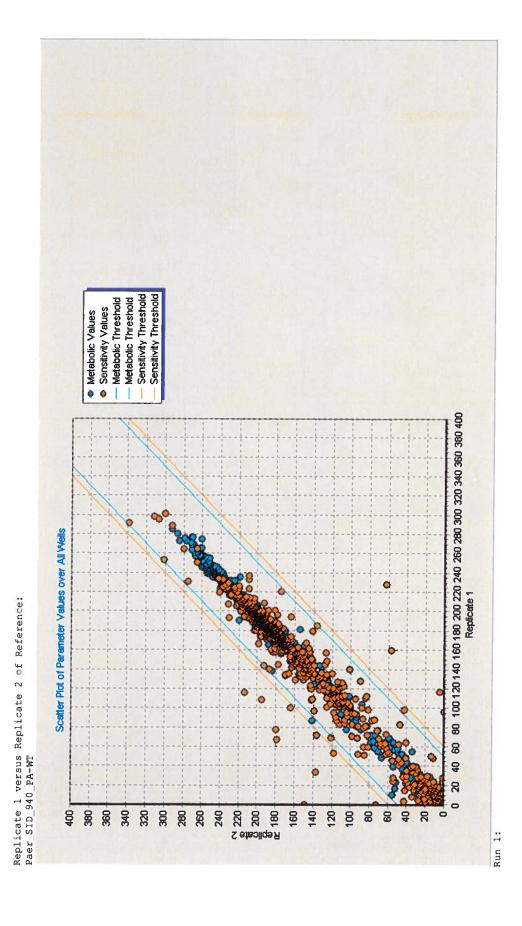
Résultats bruts des Phenotype Microarrays

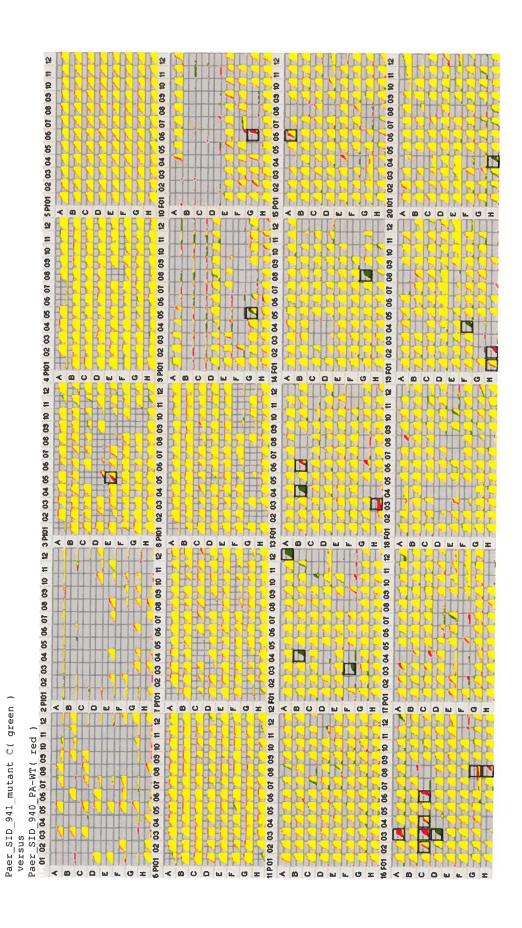
La description des paramètres expérimentaux utilisés dans chaque puits est disponible sur le site web : http://www.biolog.com/pmMicrobialCells.html.

PA14 versus phzC1'C2'

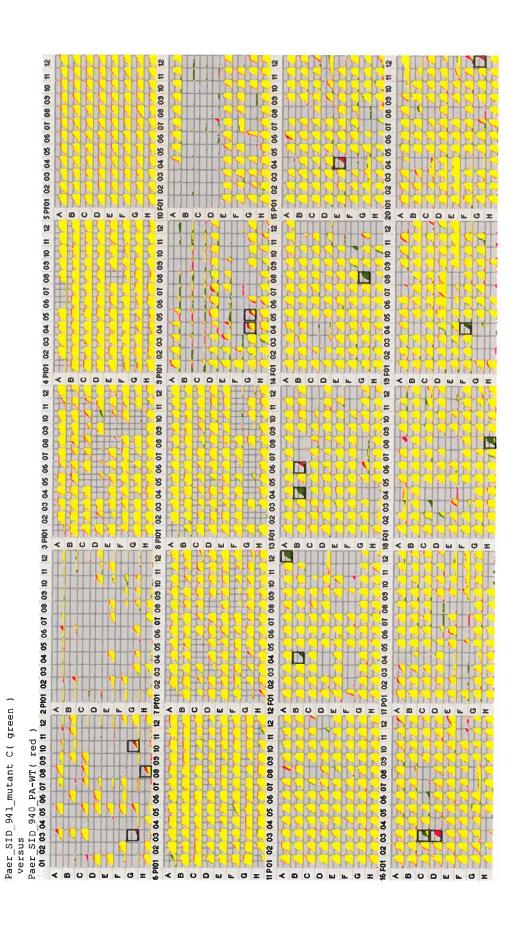
Replicate 1 versus Replicate 2 of Test: Paer_SID_941_mutant C



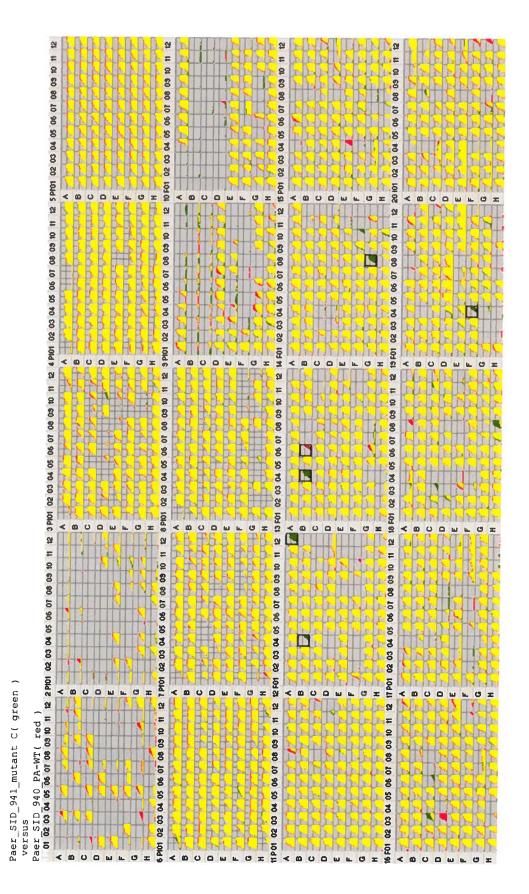




ın 2:



Consensus:



	941 mutant C		940 PA-WT
PM Report:	Paer_SID_	versus	Paer SID

						v
	Carbenicillin	Carbenicillin	Azlocillin	Phenethicillin	Oxacillin	2,2 -Dipyridyl
	175	183	168	06	63	-62
Phenotypes Gained:						Lost:
ypes	A12	905	B04	F04	B04	ypes B06
Phenot	PM12B	PM14A	PM13B	PM19	PM12B	Phenotypes Lost: PM13B B06

wall, lactam
wall, lactam
wall, lactam
wall, lactam

chelator, Fe++

2,2 -Dipyridyl

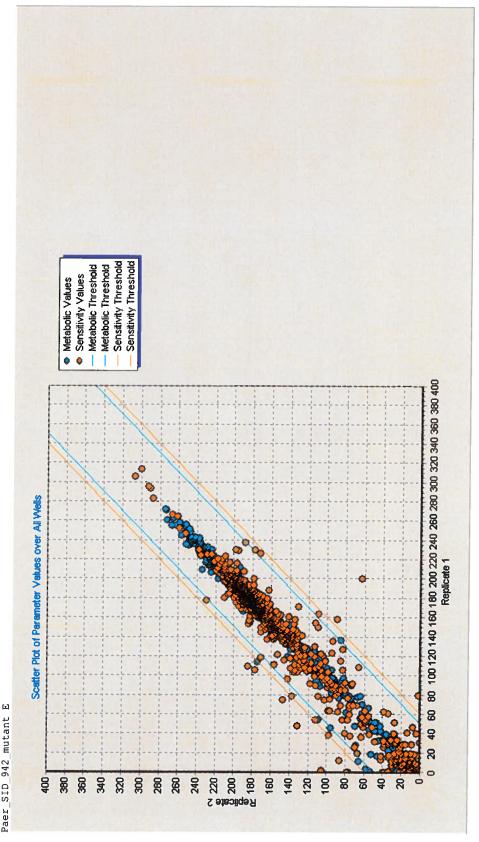
Appendix:

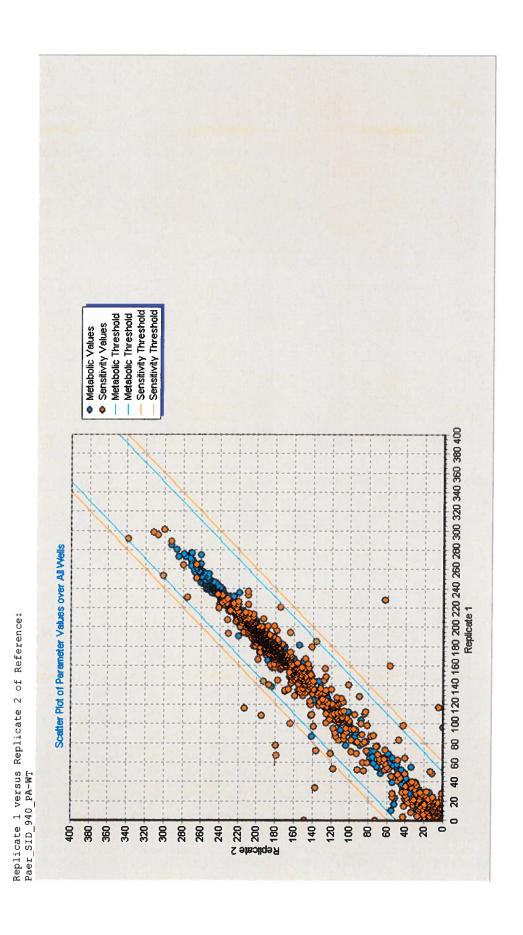
Carbon and Nutrient Max Read Hour: 024 Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Max Read Hour: 048 Sensitivity Max Read Hour: 024

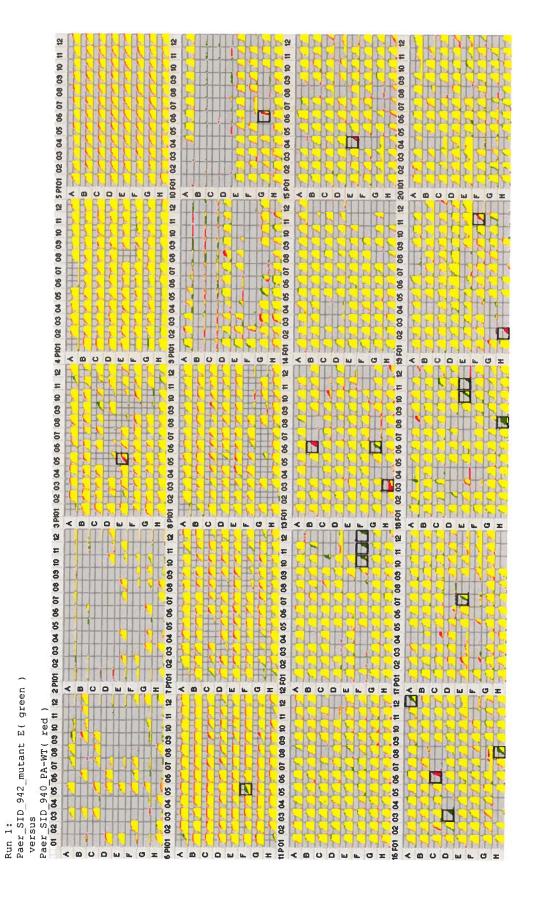
Metabolic Distance Threshold: 050 Sensitivity Distance Threshold: 060

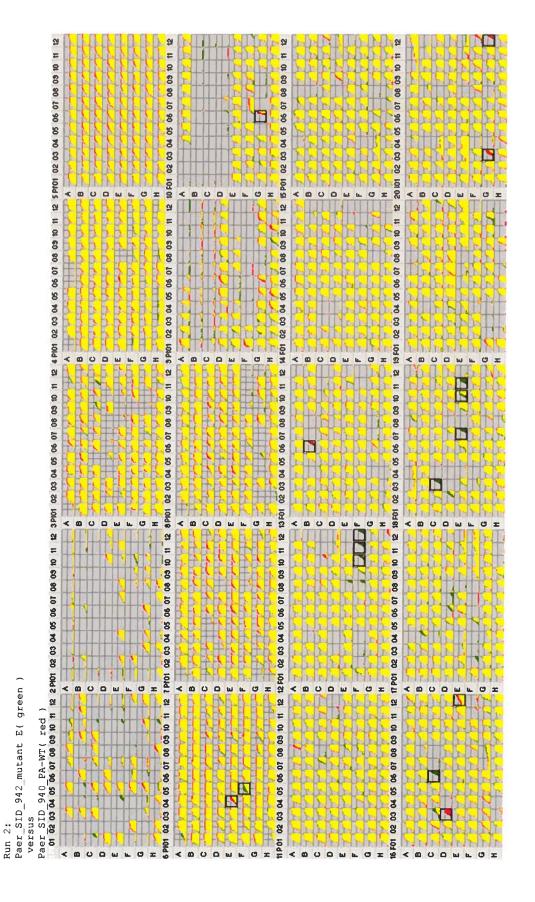
PA14 versus pqsE-

Replicate 1 versus Replicate 2 of Test: Paer_SID_942_mutant E









02 03 04 05 06 07 08 05 10 H 12 10 11 12 10 11 12 03 00 11 60 90 8 8 8 6 6 0 8 8 8 8 8 8 3 3 3 8 8 (() () 10 FO1 02 8 8 15 PO1 12 S Pro1 Designation of the state of the **₽** ä = 53 08 09 10 11 08 03 10 93 50 2 8 07 08 12 3 PIO1 02 03 04 05 06 01 12 4 PIO1 02 03 04 05 06 01 50 8 8 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 8 6 H K W F01 02 03 04 0 5 6 8 8 9 0 0 0 = < 8 0 0 w O E < B U D 2 Ð 03 to 11 08 009 10 요 08 03 06 07 03 04 05 06 07 3 PIO1 02 03 04 05 12 8 PIO1 02 03 04 05 04 05 06 07 08 09 10 11 12 18 POI 02 03 12 13 FOI 02 I छ F 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 02 03 04 05 06 07 08 03 10 11 06 07 08 09 10 ti t2 7 Pf01 02 03 04 05 03 04 11 12 2 PIO1 SID 942 mutant E(green) # F & E < # 12 01 02 03 04 05 06 07 08 05 10 11 12 PA-WT (red 08 03 10 9 8 PA-WT (8 06 07 10 90 04 05 S 11 P 01 02 03 04 05 3 Paer SID 01 02 03 0 ខ versus TENEDE TO LE < 8 0 0 m m G = < B O D M F Q = 4 < B O D

	5-Fluoroorotic Acid His-Asp Antimony (III) chloride	2,2'-Dipyridyl pH 9,5 + Putrescine
	208 65	-61
PM Report: Paer_SID_942_mutant E_versus Paer_SID_940_PA-WT_	Phenotypes Gained: PM12B F10,F11,F12 PM06 F05 PM18C E10,E11	Phenotypes Lost: PM13B B06 PM10 G06

Appendix:

chelator, Fe++ pH, deaminase

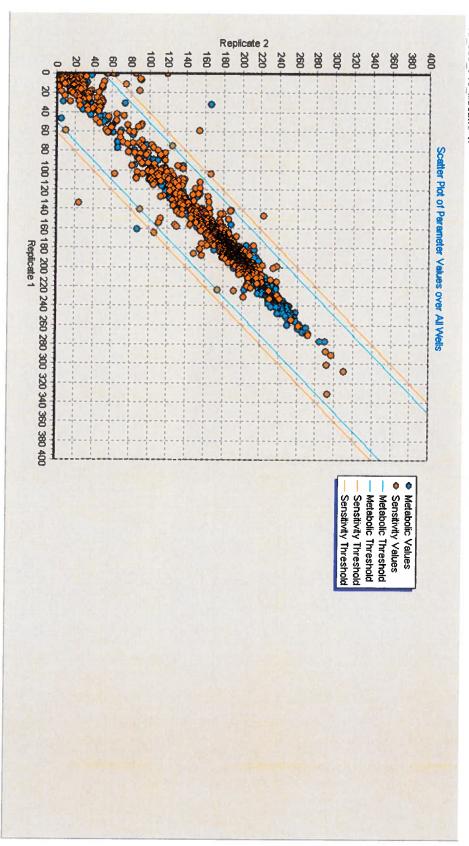
N-source toxic cation

Carbon and Nutrient Max Read Hour: 024 Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Max Read Hour: 048 Sensitivity Max Read Hour: 024

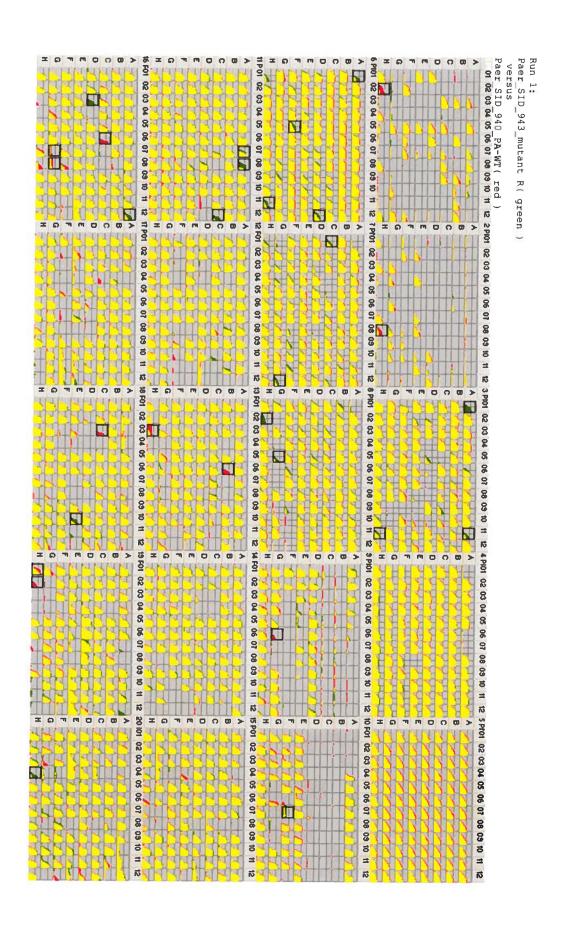
Metabolic Distance Threshold: 050 Sensitivity Distance Threshold: 060

PA14 versus rhIR-

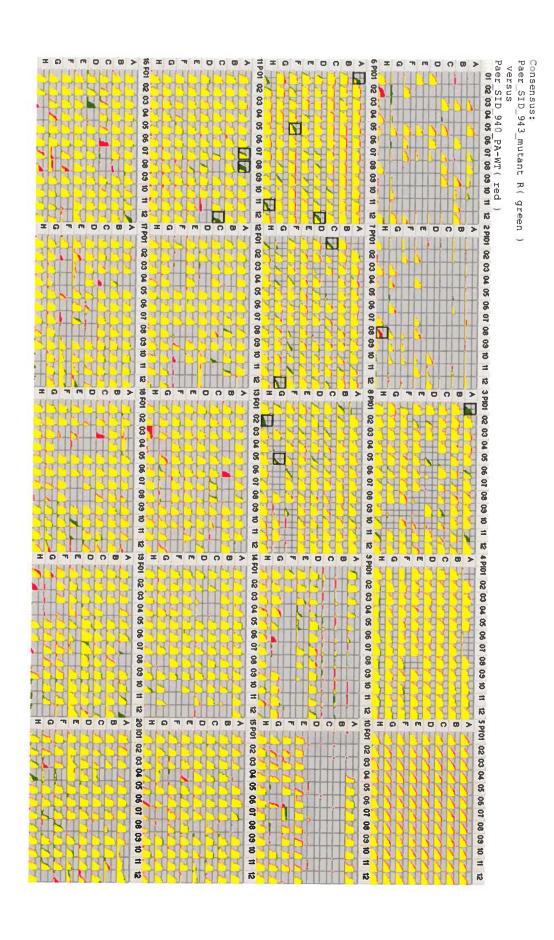
Replicate 1 versus Replicate 2 of Test:
Paer_SID_943_mutant R



Replicate 1 versus Replicate 2 of Reference: Paer_SID_940_PA-WT 20 45 68 69 69 69 69 69 120 140 340 360 38 6 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 Replicate 1 Scatter Plot of Parameter Values over All Wells Metabolic Values
 Sensitivity Values
 Metabolic Threshold
 Metabolic Threshold
 Sensitivity Threshold
 Sensitivity Threshold



Paer SID 943 mutant R(green Paer SID 940 PA-WT (red 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 1 提提 222 id) 11 12 2 P101 02 1 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 3 9101 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 4 PIO1 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 5 PIO1 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 E O 7 M C C O >



PM Report:
Paer_SID_943_mutant R PM03B PM06 PM06 PM06 PM07 PM07 PM08 PM08 PM11C PM11C Paer_SID_940_PA-WT_ PM02A H08 Phenotypes Lost: Phenotypes Gained: versus A07, A08 C12 H02 D12 H11 C01 A01 G12 G05 F05 142 125 73 72 63 61 61 64 86 -88 Negative Control Gly-Gly-D-Leu Glu-Tyr Leu-Met Tyr-Phe Gly-D-Ser Chlortetracycline Minocycline Negative Control Met-Ile Putrescine His-Asp N-source N-source N-source protein synthesis; 30S ribosomal subunit; tetracycline protein synthesis; 30S ribosomal subunit; tetracycline N-source C-source N-source N-source N-source N-source

Carbon and Nutrient Max Read Hour: Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Max Read Hour: Sensitivity Max Read Hour:

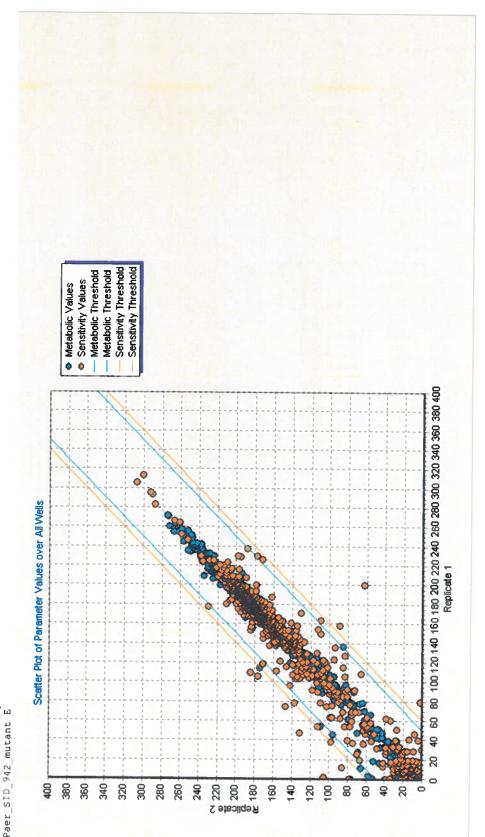
024 048 024

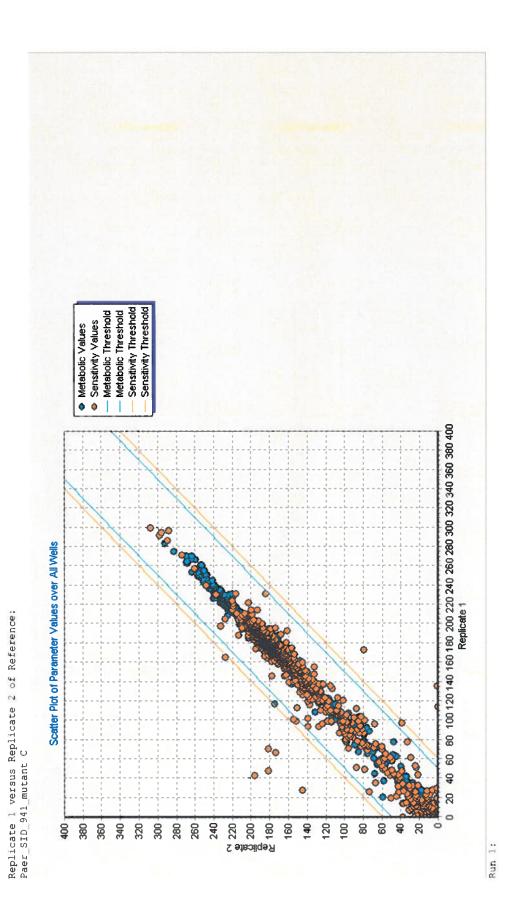
Metabolic Distance Threshold: 050 Sensitivity Distance Threshold: 060 Appendix:

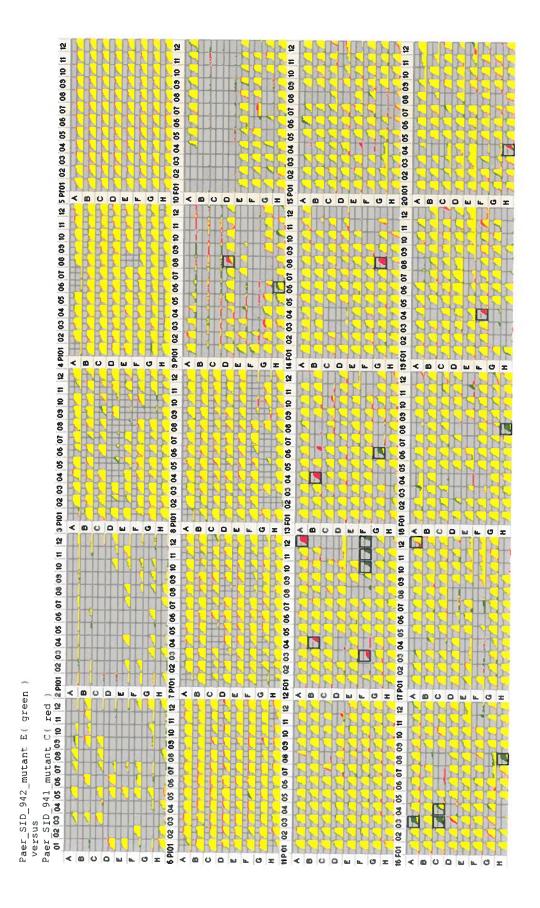
386

pqsE- versus phzC1'C2'

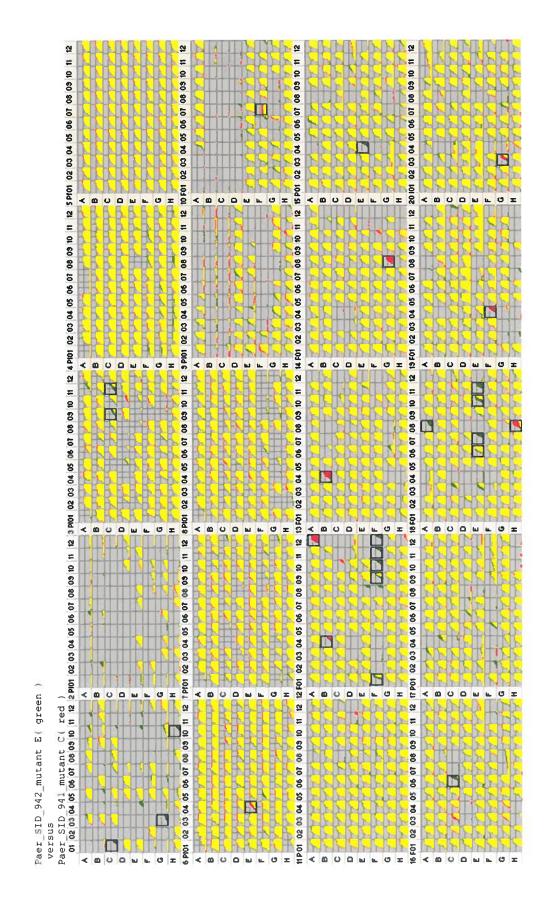
Replicate 1 versus Replicate 2 of Test: Paer_SID_942_mutant E

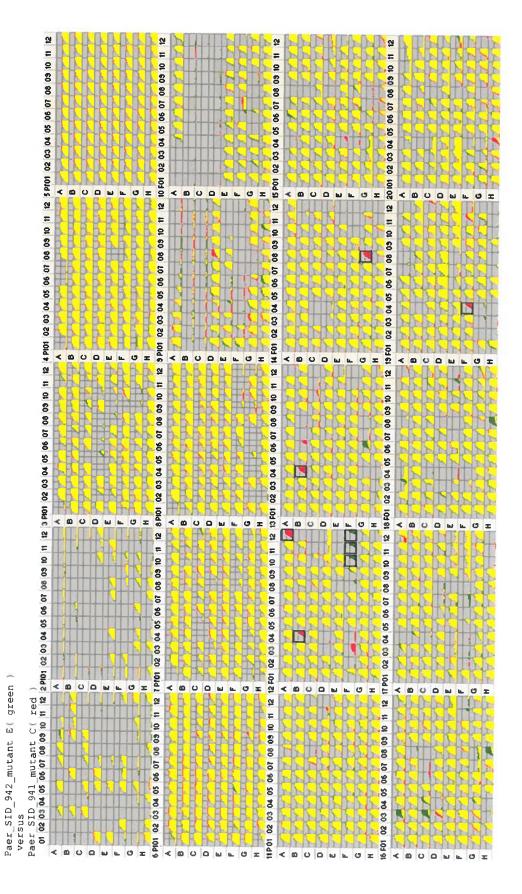






Run





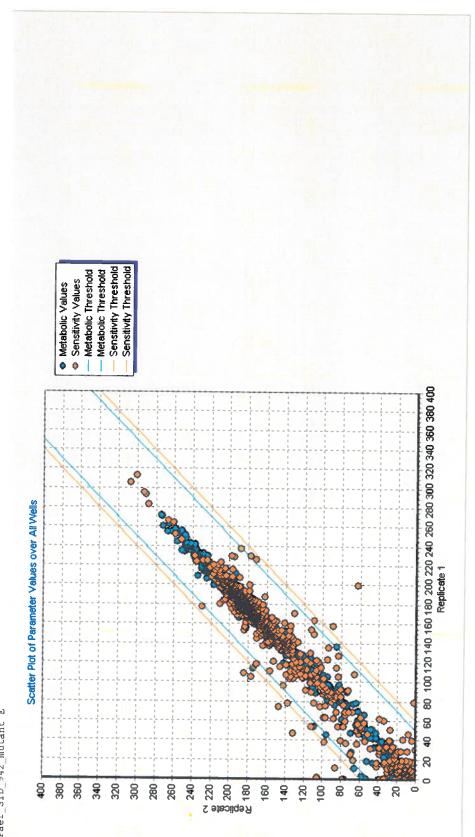
PM Report:
Paer_SID_942_mutant E_
versus
Paer_SID_941_mutant C_
Phenotypes Gained:
PM12B F10,F11,F12 273 5-Fluoroorotic Acid
Phenotypes Lost:
PM12B A12 -190 Carbenicillin
PM13B B04 -165 Azlocillin
PM13B B04 -165 Phenethicillin
PM12B B04 -99 oxacillin

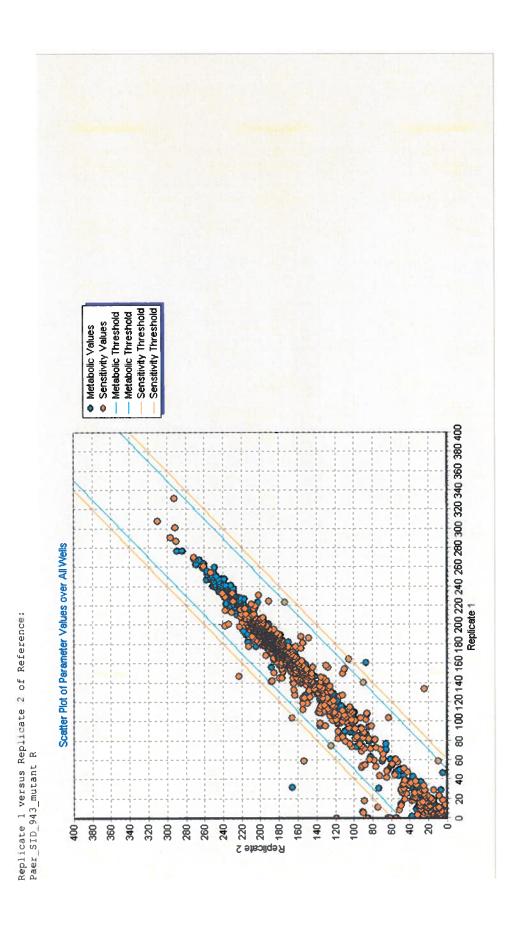
wall, lactam
wall, lactam
wall, lactam
wall, lactam

Appendix:

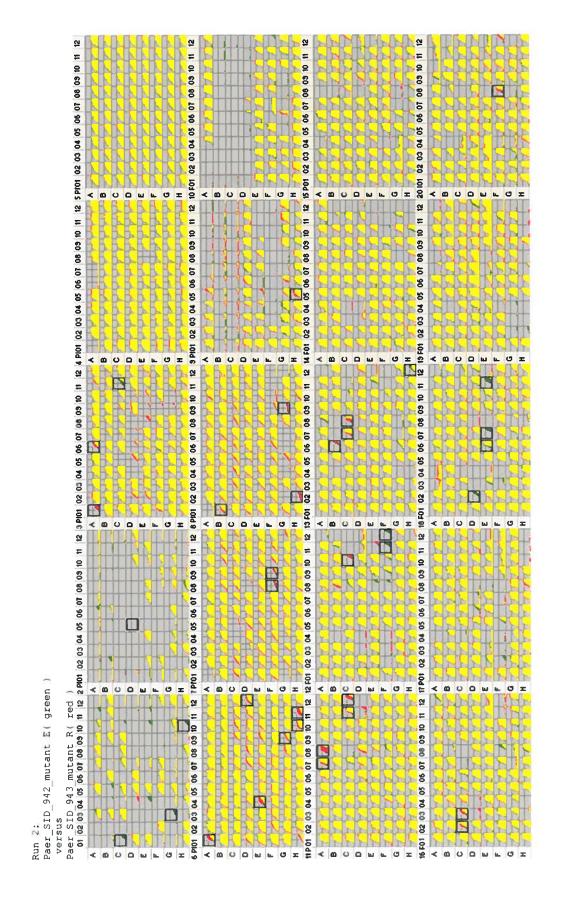
Carbon and Nutrient Max Read Hour: 024 Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Max Read Hour: 048 Sensitivity Max Read Hour: 024 Metabolic Distance Threshold: 050 Sensitivity Distance Threshold: 060

Replicate 1 versus Replicate 2 of Test: Paer_SID_942_mutant E





02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 3 P101 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 4 P101 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 5 P701 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 08 03 10 2 P 5 8 8 8 6 6 5 90 50 8 90 S all 8 03 04 < 0 0 0 W F G E ᅙ < B U D U L < 0 0 0 m F 0 ± ū Ö = 09 10 1 00 00 2 8 8 8 8 06 07 03 04 05 06 07 90 50 02 03 04 1 9 PIO1 02 14 F01 < 0 0 u u p p **0** 0 0 w k 0 x 11 12 13 F01 02 03 04 05 06 07 08 03 10 11 12 않 03 05 00 10 11 03 10 11 12 8 PIOT 02 03 04 05 06 07 08 09 10 0 05 06 07 08 0 03 04 05 06 07 08 0 2 Pi01 000000 Paer_SID_942_mutant E(green red # Ö E 0 00 00 00 00 10 943 mutant R(8 80 03 04 05 06 07 3 Paer SID 01 02 03 0 < 8 0 0 m m 0 m





PM Report: Paer_SID_942_mutant E_ Paer_SID_943_mutant R_ versus

5-Fluoroorotic Acid 185 Phenotypes Gained: PM12B F11,F12

11e-Met
Chlortetracycline
Minocycline Negative Control Gly-Gly-D-Leu Glu-Tyr Leu-Met -134 -110 -71 -62 -62 -151 -85 Phenotypes Lost:
PM03B A01
PM06 D12
PM06 H11
PM06 G09
PM1C A07,A08

protein synthesis; 30S ribosomal subunit; tetracycline protein synthesis; 30S ribosomal subunit; tetracycline N-source N-source N-source N-source N-source

Appendix:

Carbon and Nutrient Max Read Hour: 024 Nitrogen, Phosphorus, Sulfur Max Read Hour: 048 Sensitivity Max Read Hour: 024

Metabolic Distance Threshold: 050 Sensitivity Distance Threshold: 060

Appendice G

Liste des ADNc identifiés chez le mutant pqsE- par la méthode du SCOTS

Séquences d'ADNc présents seulement dans pqsE- et codées exclusivement dans une région intergénique.

Seq_name	Hit_start	Hit_end	Gene_name
40 P000000 040 f .			
40_P0900696_042.fsta	1229847	1230148	IR_1908,PA14_14420,
F08_P0901041_054.fsta	1229793	1230023	IR_1908,PA14_14420,
100_P0900793_060.fsta	1925697		IR_2940,PA14_22090,
B11_P0901041_093.fsta	1925695	1926050	
C10_P0900952_076.fsta	1925598	1925861	IR_2940,PA14_22090,
74_P0900793_048.fsta	290351	290666	IR_434,PA14_03240,
G05_P0901041_020.fsta	290776	291041	IR_434,PA14_03240,
F11_P0901041_085.fsta	2867090	2867363	IR_4372,PA14_32810,
A02_P0900952_016.fsta	3515637	3515988	IR_5204,PA14_39480,
B11_P0900952_093.fsta	3515410	3515688	IR_5204,PA14_39480,
E07_P0900952_055.fsta	3922823	3923092	IR_5802,PA14_44060,
116_P0900793_090.fsta	4206571	4206911	IR_6238,PA14_47210,
65_P0900705_086.fsta	5274665	5274965	IR_7836,PA14_59210,

Séquences d'ADNc présents seulement dans pqsE- et codées dans un cadre ouvert de lecture

Seq_name	Hit_start	Hit_end	Gene_start	Gene_end	Gene_name	PA14_XXXXX
21_P0900697_031.fsta	114731	115124	113281	115506		PA14_01160
E05_P0900952_039.fsta	158972	159306	158517	159413		PA14_01730
A01_P0900952_015.fsta	292734	293086	291568	293184		PA14_03250
D09_P0900952_073.fsta	293529	293917	293187	293936		PA14_03265
G03_P0901041_004.fsta	294175	294452	294101	297238		PA14_03270
G11_P0900952_083.fsta	303389	303788	302683	303804		PA14_03320
D07_P0901041_057.fsta	307210	307569	306896	307666		PA14_03360
A06_P0901041_048.fsta	310588	310937	309749	311728		PA14_03380
B07_P0900952_061.fsta	310587	310933	309749	311728		PA14_03380
E06_P0900952_040.fsta	353027	353369	352562	353665	spuD	PA14_03920
F02_P0900952_006.fsta	354678	355027	354084	355181	spuE	PA14_03930
H05_P0901041_017.fsta	534659	535047	534444	535331	•	PA14 06030
120_P0900793_024.fsta	641289	641609	640581	642266		PA14_07480
99_P0900793_059.fsta	644695	645032	643347	647084		PA14_07500
B01_P0900952_013.fsta	644540	644884	643347	647084		PA14_07500
52_P0900697_030.fsta	660832	661118	659551	661473		PA14_07680
26_P0900697_064.fsta	666952	667299	666574	669348	ostA	PA14_07770
E03_P0900952_023.fsta	730019	730282	729719	731062		PA14_08540
117_P0900793_007.fsta	733617	733967	733095		16S-rRNA	PA14_08570

A04_P0901041_032.fsta	733887	734237	733095	734620	16S-rRNA	PA14_08570
B02_P0900952_014.fsta	734072	734330	733095	734620	16S-rRNA	PA14_08570
D02_P0900952_010.fsta	733347	733639	733095	734620	16S-rRNA	PA14_08570
G06_P0900952_036.fsta	733825	734160	733095	734620	16S-rRNA	PA14_08570
79_P0900793_095.fsta	736807	737056	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
D03_P0901041_025.fsta	737502	737942	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
D11_P0900952_089.fsta	736376	736736	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
E10_P0901041_072.fsta	737002	737124	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
F07_P0900952_053.fsta	736999	737318	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
G02_P0901041_003.fsta	735979	736105	735093	737983	23S-rRNA	PA14_08600
C05_P0900952_043.fsta	742059	742337	741311	742504	tufB	PA14_08680
H09_P0900952_065.fsta	745102	745280	745034	745534	rpIJ	PA14_08740
H02_P0900952_002.fsta	748301	748806	746203	750276	rpoB	PA14_08760
70_P0900793_016.fsta	751395	751661	750342	754541	rpoC	PA14_08780
89_P0900793_077.fsta	751104	751246	750342	754541	rpoC	PA14_08780
128_P0900793_088.fsta	755901	756238	755665	757785	fusA1	PA14_08820
B05_P0900952_045.fsta	759568	759902	759559	760194	rplC	PA14_08850
35_P0900696_025.fsta	762788	763144	762589	763275	rpsC	PA14_08910
C07_P0901041_059.fsta	771955	772364	771395	772396	rpoA	PA14_09115
34_JB2001_020.fsta	854234	854249	854230	854793		PA14_09940
124_P0900793_056.fsta	903755	904165	903617	905044		PA14_10500
B08_P0900952_062.fsta	904380	904759	903617	905044		PA14_10500
C12_P0901041_092.fsta	904032	904371	903617	905044		PA14_10500
6_JB2001_001.fsta	1057382	1057581	1055410	1058031	leuS	PA14_12230
46_P0900697_095.fsta	1135581	1135831	1135535	1136926		PA14_13190
A10_P0901041_080.fsta	1154999	1155470	1154465	1156819	fecA	PA14_13430
D07_P0900952_057.fsta	1301763	1302004	1301126	1302328		PA14_15350
H07_P0901041_033.fsta	1313431	1313708	1313291	1314076	trbJ	PA14_15520
G11_P0901041_068.fsta	1319246	1319722	1317407	1320187		PA14_15580
A11_P0900902_095.fsta	1333839	1333853	1332509	1333900		PA14_15670
C03_P0900952_027.fsta	1377059	1377508	1376662	1378728		PA14_16180
D05_P0900952_041.fsta	1463240	1463787	1463112	1463852	rpsB	PA14_17060
C04_P0900952_028.fsta	1499596	1499897	1499097	1500101	rpoS	PA14_17480
C07_P0900952_059.fsta	1499252	1499580	1499097	1500101	rpoS	PA14_17480
91_P0900793_093.fsta	1682876	1683109	1682727	1684298	mqoA	PA14_19470
5_JB2001_084.fsta	1810342	1810356	1809617	1816675		PA14_21020
95_P0900793_027.fsta	1903620	1903940	1902163	1904259	prc	PA14_21880
B07_P0901041_061.fsta	1923657	1924001	1923032	1924132		PA14_22090
E04_P0901041_024.fsta	1927781	1928197	1927460	1928419		PA14_22110
92_P0900793_094.fsta	1930609	1930837	1929042	1931366		PA14_22120
119_P0900793_023.fsta	1939741	1940071	1939714	1941291		PA14_22270
86_P0900793_046.fsta	1996839	1997182	1996676	1998040	oprB	PA14_23030
103_P0900793_091.fsta	2024881	2025208	2024157	2025836	rpsA	PA14_23330

400 0000000				
106_P0900793_010.fsta			2031909 o	rfE PA14_23390
23_P0900697_047.fsta	2039581 2039826		2040149 o	
18_JB2001_066.fsta	2210444 2210702		2211586 a	roP1 PA14_25270
67_JB2001_084.fsta	2219265 2219573		2220507 st	h PA14_25390
C06_P0900952_044.fsta		2219113	2220507 st	h PA14_25390
B08_P0901041_062.fsta		2418001	2419185	PA14_27940
G01_P0900952_003.fsta		2460195	2461094	PA14_28530
62_P0900697_094.fsta	2482580 2482943	2480409	2485532	PA14_28810
F11_P0900952_085.fsta		2480409	2485532	PA14_28810
130_P0900793_006.fsta		2485638	2488136	PA14_28820
D06_P0901041_042.fsta		2596164	2597945 nu	JOD PA14_29990
B05_P0901041_045.fsta		2625768	2627093	PA14_30320
A04_P0900952_032.fsta		2646291	2647394	PA14_30570
D02_P0900902_010.fsta		2654014	2655162 pc	ISH PA14_30630
G06_P0901041_035.fsta		2674712	2676055	PA14_30830
G09_P0901041_052.fsta		2674712	2676055	PA14_30830
41_JB2001_051.fsta	2696697 2697002	2693904	2697041	PA14_31010
D08_P0900952_058.fsta	2862627 2863043	2848568	2864206	PA14_32790
104_P0900793_092.fsta	2889669 2889839	2889137	2890393 gly	
61_P0900697_093.fsta	2968798 2969112	2956615	2972064	PA14_33610
49_P0900697_013.fsta	2984894 2985280	2978649	2985995 pv	dD PA14_33650
B10_P0901041_078.fsta	2981962 2982401	2978649	2985995 pv	dD PA14_33650
42_P0900696_057.fsta	2986419 2986697	2986159	2988606 fpv	_
51_P0900697_029.fsta	2986419 2986697	2986159	2988606 fp\	
C03_P0901041_027.fsta	2986761 2986996	2986159	2988606 fpv	-
E03_P0901041_023.fsta	2986245 2986663	2986159	2988606 fp\	
80_P0900793_096.fsta	2988994 2989399	2988709	2990358 pv	
39_JB2001_036.fsta	2994667 2994931	2993821	2995167	PA14_33730
E08_P0900902_056.fsta	3048207 3048222	3047822	3048616	PA14_34280
H10_P0900952_066.fsta	3177032 3177302	3176984	3177358	PA14_35730
G10_P0901041_067.fsta	3179281 3179537	3177507	3180521	PA14_35740
H02_P0901041_084.fsta	3177730 3178075	3177507	3180521	PA14_35740
G03_P0900952_019.fsta	3181631 3182127	3181532	3182437	PA14_35770
D08_P0901041_058.fsta	3189026 3189050	3188265	3189263 tnp	
A04_P0900902_032.fsta	3270671 3270689	3269786	3271984 glgi	
24_P0900697_048.fsta	3401447 3401737	3400608	3401978	PA14_38130
G10_P0900952_068.fsta	3403076 3403429	3402135	3403511	PA14_38140
	3689006 3689261	3688547	3689929 cys	
F01_P0900952_005.fsta	3695305 3695744	3695262	3696125	PA14_41440
	3825090 3825444	3825042	3826622	PA14_43000
	3831953 3832337	3831886	3832404 hcp	
F01_P0901041_005.fsta	3904860 3905239	3904068	3905972 htp	-
G08_P0901041_051.fsta	3908880 3909228	3908740	3909504	PA14_43910
				1 474-43210

115_P0900793_089.fsta	3911559	3911873	3911275	3912162	sucD	PA14_43940
A05_P0901041_047.fsta	3916544	3916872	3916434	3919265	sucA	PA14_44010
E05_P0901041_039.fsta	3918029	3918438	3916434	3919265	sucA	PA14_44010
E10_P0900952_072.fsta	3951514	3951986	3950769	3952196		PA14_44370
4_JB2001_083.fsta	4002981	4003249	4000789	4003317		PA14_44900
A03_P0900952_031.fsta	4003697	4004053	4003314	4005023		PA14_44910
E11_P0900952_087.fsta	4049671	4050071	4049648	4050127		PA14_45500
E08_P0900952_056.fsta	4278088	4278402	4277525	4278964	aprA	PA14_48060
C08_P0900952_060.fsta	4350102	4350484	4349378	4350664		PA14_48930
H04_P0900952_018.fsta	4396218	4396542	4394703	4397594	nrdA	PA14_49460
76_P0900793_064.fsta	4400038	4400332	4399221	4401008		PA14_49480
G07_P0900952_051.fsta	4405076	4405378	4403159	4405534	pyoS3A	PA14_49520
E02_P0900952_008.fsta	4485285	4485571	4485245	4485652	flgB	PA14_50480
C05_P0901041_043.fsta	4487269	4487716	4486950	4488071	braC	PA14_50520
H08_P0900952_050.fsta	4487231	4487507	4486950	4488071	braC	PA14_50520
A08_P0900952_064.fsta	4609354	4609677	4608130	4609845	proS	PA14_51900
66_P0900705_086.fsta	4619723	4620003	4619455	4620171		PA14_52060
B03_P0901041_029.fsta	4742583	4742984	4742312	4743226		PA14_53490
C01_P0901041_011.fsta	4751811	4752160	4751681	4752283		PA14_53580
27_JB2001_081.fsta	4759703	4760012	4758953	4760041		PA14_53660
F10_P0901041_070.fsta	4759235	4759474	4758953	4760041		PA14_53660
82_P0900793_014.fsta	4813843	4814186	4813655	4814227		PA14_54240
B06_P0900952_046.fsta	4859239	4859644	4859110	4860012		PA14_54830
84_P0900793_030.fsta	4863169	4863459	4862635	4863513		PA14_54880
H04_P0901041_002.fsta	4871476	4871928	4867504	4871967		PA14_54920
97_P0900793_043.fsta	4878946	4879301	4878789	4880135		PA14_54950
114_P0900793_074.fsta	4953859	4954285	4952288	4955171	23S-rRNA	PA14_55631
H11_P0901041_065.fsta	4953930	4954262	4952288	4955171	23S-rRNA	PA14_55631
A07_P0900952_063.fsta	5110582	5110759	5109689	5110888	ftsW	PA14_57360
B04_P0901041_030.fsta	5132739	5133171	5132303	5133202		PA14_57630
A09_P0900952_079.fsta	5150915	5151285	5150876	5151673		PA14_57870
G07_P0901041_036.fsta	5154547	5154810	5154424	5154996		PA14_57910
B03_P0900952_029.fsta	5163152	5163306	5162131	5163507	fumC1	PA14_58030
F09_P0900952_069.fsta	5193279	5193708	5192561	5193829		PA14_58320
127_P0900793_087.fsta	5195352	5195615	5195069	5196682		PA14_58350
123_P0900793_055.fsta	5200851	5201086	5200657	5202258		PA14_58390
D02_P0901041_010.fsta	5233093	5233362	5232749	5233456		PA14_58720
85_P0900793_045.fsta	5237392	5237700	5237206	5238078	pilD	PA14_58770
8_JB2001_017.fsta	5283191	5283206	5282137	5283717	pilQ2	PA14_59290
44_P0900697_079.fsta	5288514	5288802	5288357	5289001		PA14_59370
C10_P0901041_076.fsta	5295578	5296041	5295561	5297012		PA14_59530
A07_P0901041_063.fsta	5297802	5298152	5297117	5299366		PA14_59540
E12_P0901041_088.fsta	5322844	5323100	5320295	5323549	rcsC	PA14_59780

131_P0900793_021.fsta		5326963	5324826	5327621		PA14_59800
F10_P0900952_070.fsta	5325776	5326125	5324826	5327621		PA14_59800
11_JB2001_034.fsta		5330903	5330226	5331335	5	PA14_59840
112_P0900793_058.fsta		5339743	5337054	5339996	5	PA14_59940
F04_P0900952_022.fsta	5345261	5345533	5344464	5345975		PA14_60020
48_JB2001_052.fsta	5351715	5352080	5350432	5352363		PA14_60080
64_JB2001_083.fsta	5351727	5352063	5350432	5352363		PA14_60080
C02_P0900952_012.fsta		5352171	5350432	5352363		PA14_60080
C02_P0901041_012.fsta		5351224	5350432	5352363	-	PA14_60080
D03_P0900952_025.fsta	5354887	5355139	5354756	5355289	dcd2	PA14_60120
38_JB2001_035.fsta	5373268	5373602	5373154	5376630	pilY1	PA14_60310
D10_P0901041_074.fsta	5375002	5375436	5373154	5376630	pilY1	PA14_60310
102_P0900793_076.fsta	5461243	5461382	5458870	5464854		PA14_61200
F08_P0900952_054.fsta	5562313	5562722	5561148	5563442		PA14_62350
D11_P0901041_089.fsta	5600886	5601276	5599356	5601878	infB	PA14_62760
E04_P0900952_024.fsta	5888207	5888631	5887707	5888906		PA14_66100
36_P0900696_026.fsta	5914554	5914959	5912407	5915106		PA14_66320
108_P0900793_026.fsta	5949834	5949987	5949823	5950446	pilO	PA14_66640
73_P0900793_047.fsta	5989345	5989567	5988232	5989809		PA14_67090
33_P0900696_010.fsta	6081500	6081859	6080538	6082067		PA14_68140
45_P0900697_080.fsta	6189133	6189540	6189131	6189613	algQ	PA14_69390
C11_P0901041_091.fsta	6463004	6463383	6462110	6464314		PA14_72540
121_P0900793_039.fsta	6477756	6477773	6477682	6479448		PA14_72740
125_P0900793_071.fsta	6477756	6477773	6477682	6479448		PA14_72740
13_JB2001_049.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
132_P0900793_022.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
16_JB2001_050.fsta	6477756	6477773	6477682	6479448		PA14_72740
17_JB2001_065.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
31_JB2001_082.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
7_JB2001_002.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
72_P0900793_032.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
81_P0900793_013.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
9_JB2001_018.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
98_P0900793_044.fsta	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
	6477756		6477682	6479448		PA14_72740
107_P0900793_025.fsta	6494646		6494339	6496096		PA14_72940
D10_P0900952_074.fsta			6523852	6525396	atpA	PA14_73260
G01_P0901041_086.fsta	6524000 6		6523852	6525396	atpA	PA14_73260
E01_P0900952_007.fsta	6529189	5529536	6529110	6529898	soj	PA14_73350
						_

Séquences d'ADNc présents seulement dans pqsE- et chevauchant une région intergénique et un cadre ouvert de lecture

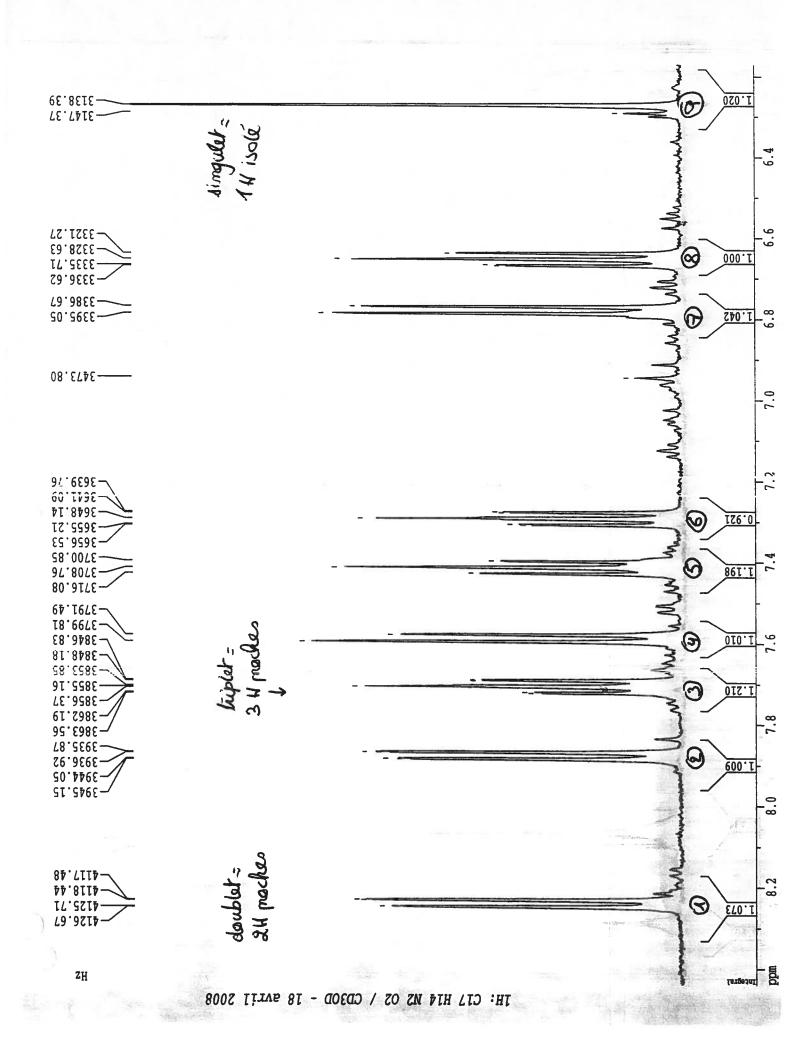
Seq_name	Hit_start	Hit_end	Gene_start	Gene_end	Gene_name
F09 P0901041 069.fsta	40496	40804	40610	40837	PA14_00480
G02_P0900952_004.fsta	451165	451593	451306	452340	PA14_05180
E09 P0901041 071.fsta	733085	733294	733095	734620	PA14_08570
H07_P0900952_049.fsta	1196008	1196276	1196245	1197924	PA14_13940
69_P0900793_015.fsta	1921750	1922155	1922000	1922695	PA14_22080
101_P0900793_075.fsta	2043672	2043923	2043798	2044127	PA14_23480
22 P0900697_032.fsta	2192458	2192828	2192750	2194897	PA14_25080
19_P0900697_016.fsta	2423771	2424055	2423812	2424852	PA14_28000
D01_P0901041_009.fsta	2456331	2456594	2456363	2456797	PA14_28440
C04_P0901041_028.fsta	2565887	2566218	2565968	2566324	PA14_29600
F06_P0900952_038.fsta	2659441	2659767	2659452	2660507	PA14_30690
87_P0900793_061.fsta	3691686	3692044	3691732	3692229	PA14_41390
55_P0900697_046.fsta	3695232	3695423	3695262	3696125	PA14_41440
14_P0900697_015.fsta	4014796	4014929	4014866	4015756	PA14_45020
F03_P0901041_021.fsta	4199263	4199562	4199269	4201467	PA14_47140
50_P0900697_014.fsta	4355734	4356065	4355849	4356442	PA14_49040
54_P0900697_045.fsta	4357277	4357604	4357368	4357865	PA14_49060
77_P0900793_079.fsta	4433443	4433763	4433492	4433812	PA14_49850
94_P0900793_012.fsta	4605961	4606224	4606220	4607551	PA14_51880
B04_P0900952_030.fsta	5007225	5007429	5007248	5007622	PA14_56070
E06_P0901041_040.fsta	5267894	5268254	5268174	5270099	PA14_59180
37_P0900696_041.fsta	5297090	5297493	5297117	5299366	PA14_59540
H06_P0900952_034.fsta	5376742	5377038	5376956	5377381	PA14_60320
71_P0900793_031.fsta	5807044	5807335	5807061	5807507	PA14_65150
90_P0900793_078.fsta	6116245	6116526	6116265	6116621	PA14_68570
E02_P0901041_008.fsta	126370	126730	125293	126417	PA14_01290
A09_P0901041_079.fsta	301783	302124	300333	301931	PA14_03310
G09_P0900952_067.fsta	357124	357472	356417	357298	PA14_03950
43_P0900696_058.fsta	465549	465842	465247	465783	PA14_05340
96_P0900793_028.fsta	627992	628309	627637	628125	PA14_07290
C09_P0900952_075.fsta	663190	663589	662979	663359	PA14_07710
C08_P0901041_060.fsta	760550	760864	760208	760810	PA14_08860
129_P0900793_005.fsta	763736	764175	763700	763891	PA14_08930
25_P0900697_063.fsta	765375	765603	764899	765438	PA14_08970
109_P0900793_041.fsta	1222756	1222984	1222474		_
A10_P0900952_080.fsta	1243949	1244196	1243940	1244128	PA14_14540
G05_P0900952_035.fsta	1311520	1311791	1311170		PA14_15480
F04_P0901041_022.fsta	1488899	1489336	1488044	1489333	PA14_17320
56_JB2001_068.fsta	1937388	1937735	1937290		_
F07_P0901041_053.fsta	2030535				_
H09_P0901041_049.fsta	2199730	2200180	2199364		_
88_P0900793_062.fsta	2201314	2201556	2200840	2201454	PA14_25160

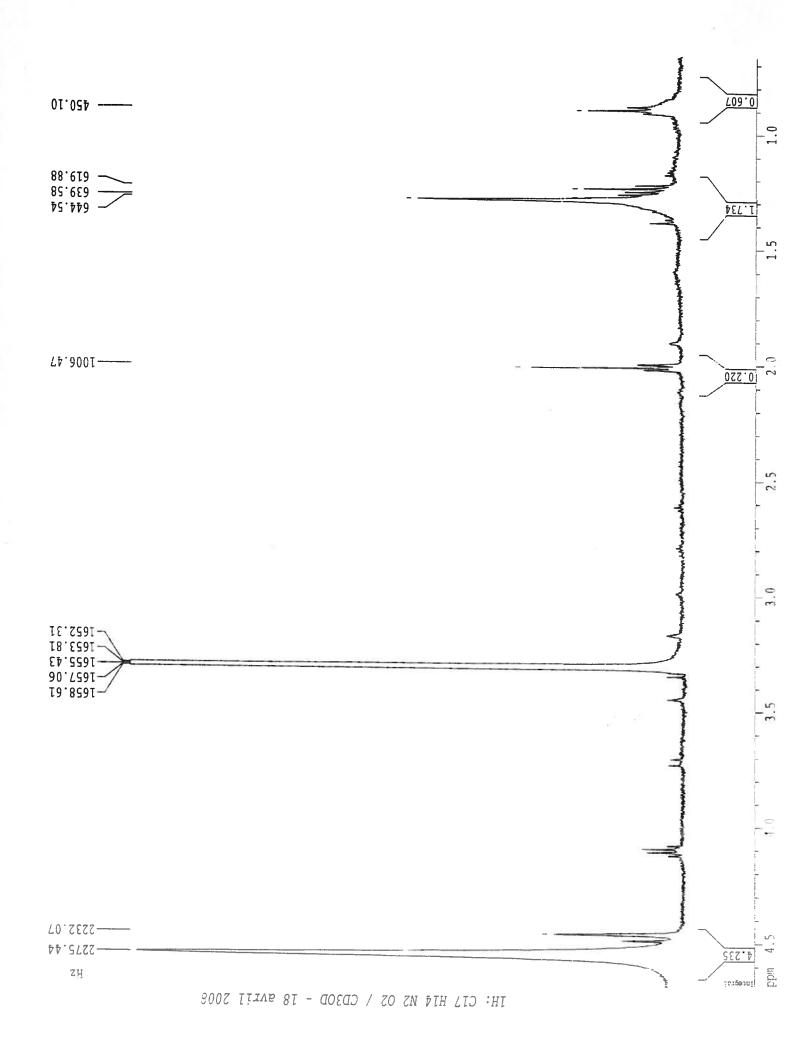
B01_P0901041_013.fsta	2396385	2396843	2206275	2200005 8444 8754
H08_P0901041_034.fsta	2417727	2417940	2396375 2417456	2396695 PA14_27640
47_P0900697_096.fsta	2480263	2480414	2417436	2417755 PA14_27930
B09_P0901041_077.fsta	2565111	2565477		2480274 PA14_28800
A06_P0900952_048.fsta	2692137	2692473	2564914 2692127	2565231 PA14_29575
F05_P0901041_037.fsta	3131050	3131266		2692432 PA14_30980
D04_P0901041_026.fsta	3176105	3176551	3129531	3131228 PA14_35190
E01_P0901041_007.fsta	3180434	3180803	3175803	3176147 PA14_35710
B02_P0901041_014.fsta	3189928	3190169	3177507	3180521 PA14_35740
G04_P0901041_019.fsta	3190218	3190544	3189302	3189946 PA14_35840
10_JB2001_033.fsta	3205977	3206297	3189927	3190406 PA14_35850
57_P0900697_061.fsta	3238854	3239180	3205778	3206281 PA14_36010
28_P0900696_009.fsta	3771667	3772021	3238696	3239118 PA14_36360
53_JB2001_067.fsta	3789530	3772021	3771428	3771775 PA14_42300
111_P0900793_057.fsta	3952846	3953134	3789086	3789562 PA14_42580
A08_P0901041_064.fsta	4202478	4202794	3952819	3953013 PA14_44390
D05_P0901041_041.fsta	4353289	4353654	4201706	4202596 PA14_47150
G08_P0900952_052.fsta	4557188	4557436	4353287	4353553 PA14_49020
113_P0900793_073.fsta	4577321	4577498	4556864	4557421 PA14_51280
B06_P0901041_046.fsta	4577321	4577608	4577077	4577454 PA14_51480
H03_P0901041_001.fsta	4577321	4577608	4577077	4577454 PA14_51480
63_P0900705_085.fsta	4580028	4580348	4577077	4577454 PA14_51480
105_P0900793_009.fsta	4585215	4585748	4579750	4580154 PA14_51510
78_P0900793_080.fsta	4586540	4586872	4584990	4585439 PA14_51560
59_P0900697_077.fsta	4734967	4735302	4586242	4586559 PA14_51590
60_P0900697_078.fsta	4734977	4735302	4734300	4735259 PA14_53390
126_P0900793_072.fsta	4758849	4759267	4734300	4735259 PA14_53390
E09_P0900952_071.fsta	4884392	4884767	4758490	4758936 PA14_53650
A11_P0900952_095.fsta	4894110	4894413	4882923	4884677 PA14_54980
118_P0900793_008.fsta	4894653	4895003	4893060	4894265 PA14_55080
122_P0900793_040.fsta	5131893	5132089	4894348	4894746 PA14_55090
B09_P0900952_077.fsta	5131840	5132227	5130715	5132040 PA14_57610
93_P0900793_011.fsta	5159653	5152227	5130715	5132040 PA14_57610
C06_P0901041_044.fsta	5293015	5293549	5158820	5159680 PA14_57970
F05_P0900952_037.fsta	5301256		5292765	5293115 PA14_59470
C09_P0901041_075.fsta	5309583	5301580	5301173	5301439 PA14_59560
D09_P0901041_073.fsta	5309583	5309925	5309339	5309839 PA14_59670
F06_P0901041_038.fsta	5312975	5309925	5309339	5309839 PA14_59670
E07_P0901041_055.fsta		5313282	5312343	5313089 PA14_59700
H01_P0901041_083.fsta	5323218	5323604	5320295	5323549 PA14_59780
75_P0900793_063.fsta	5353257	5353569	5352790	5353305 PA14_60090
D01_P0900952_009.fsta	5357554	5357942	5355824	5357743 PA14_60130
H10_P0901041_050.fsta	5376538	5376928	5373154	5376630 PA14_60310
	5719163	5719399	5718313	5719311 PA14_64180

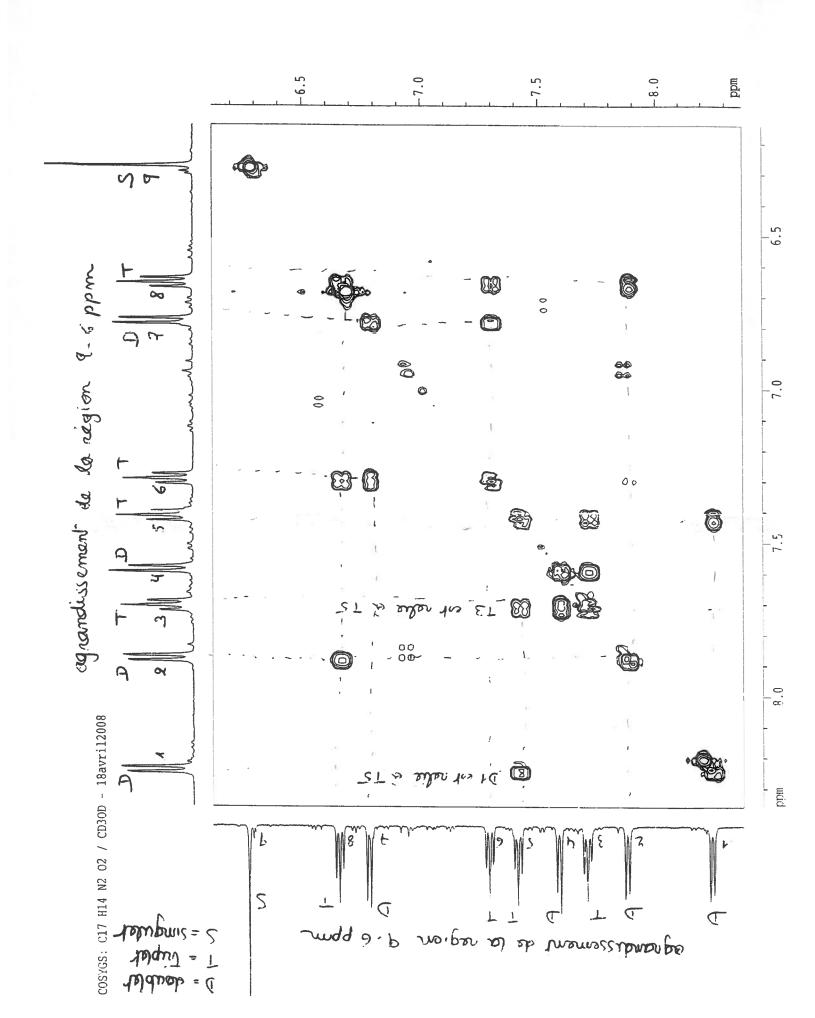
3_JB2001_068.fsta	5816935	5817269	5816307	5817176 PA	14_65270
H03_P0900952_017.fsta	5886749	5886963	5885130	5886941 PA	14_66080
58_P0900697_062.fsta	5950836	5951236	5950443	5951039 PA	14_66650
110_P0900793_042.fsta	5997622	5997867	5996863	5997744 PA	14_67190
H05_P0900952_033.fsta	5997497	5997867	5996863	5997744 PA	14_67190
D04_P0900952_026.fsta	6085030	6085420	6084412	6085293 PA	A14_68200
C11_P0900952_091.fsta	6101562	6102028	6101117	6101683 PA	14_68380
H06_P0901041_018.fsta	6157306	6157597	6156721	6157332 PA	A14_69040
B10_P0900952_078.fsta	6266645	6267038	6264129	6266693 PA	414_70270
F03_P0900952_021.fsta	6305161	6305537	6304285	6305187 PA	A14_70790
83_P0900793_029.fsta	6414551	6414978	6413789	6414586 PA	A14_71960
F02_P0901041_006.fsta	6522859	6523255	6521534	6522910 PA	A14_73240
E08_P0901041_056.fsta	6526357	6526659	6525963	6526433 PA	A14_73290

Appendice H

Données RMN sur la structure de la molecule VD279









Appendice I

Expériences annexes à l'article du DHQ (Lépine et al., 2007)

Biosynthèse de di-hydroxyquinoline (DHQ)

Les travaux que j'ai réalisés sur l'étude du DHQ ont fait l'objet d'un article publié en 2007 (Lépine et al., 2007). Celui-ci a été intégré en annexe dans le présent document (Appendice E). Ma contribution dans celui-ci a été de réaliser toutes les cultures bactériennes dans les différentes conditions expérimentales ainsi que tous les échantillons biologiques nécessaires à l'étude et analysés par spectrométrie de masse. Je présente ici quelques-unes de ces expériences ainsi certains autres résultats qui n'ont pas été ajoutés à l'article.

Enzymes impliquées dans la biosynthèse du DHQ

3.4.4.1.1 Les souches qui produisent des HAQ produisent également le DHQ

Les HAQ sont des molécules produites par un petit nombre d'espèces bactériennes, comprenant *P. aeruginosa*. Au sein de cette espèce, il existe pourtant des souches dans lesquelles aucun HAQ n'a pu être détecté. Est-ce également le cas du DHQ? Les souches produisant des HAQ sont-elles bien les mêmes qui synthétisent le DHQ? Afin de vérifier cette hypothèse, les souches PA14, PAO1 et PAK ont été analysées pour y quantifier le DHQ. Comme attendu, les souches PA14 et PAO1, qui produisent des HAQ, produisent également des quantités similaires de DHQ (26,9 +/- 0,96 mg/l), tandis que la souche PAK ne produit aucunes de ces molécules. Le DHQ est donc synthétisés par les souches capables de produire les HAQ, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle de DHQ et les HAQ ont une voie de biosynthèse similaire.

3.4.4.1.2 Le DHQ nécessite l'activité des enzymes PqsA et PqsD pour être synthétisé

Le DHQ a initialement été découvert lorsque de l'acide anthranilique tétradeutéré a été donné à une culture de *P. aeruginosa* et que les dérivés de ce composé ont été identifiés (Lépine *et al.*, 2007). On sait donc que le DHQ provient de l'acide anthranilique, tout comme les HAQ, et qu'il possède des similarités structurelles à cette famille de molécules. Serait-il alors synthétisé par les mêmes enzymes? La production de DHQ dans les mutant présumés polaires *pqsA*⁻ et *pqsB*⁻ a été analysée. Un mutant *pqsA*⁻

ne produit ni HAQ ni DHQ, tandis que pqsB produit seulement du DHQ (Lépine et al., 2007), ce qui suggère que seule PqsA est nécessaire à sa biosynthèse.

Afin de vérifier que de DHQ dépend de l'enzyme PqsA, j'ai suivi la production de DHQ dans un mutant $pqsA^-$, complémenté ou non par le plasmide pLG14 exprimant pqsABC. Comme attendu, le mutant $pqsA^-$ ne produit pas de DHQ, sauf lorsqu'il est complémenté par le plasmide pLG14 (0,20 +/- 0,022 mg/l, voir (Lépine et al., 2007) en Appendice E).

Afin de vérifier si PqsA était la seule enzyme nécessaire à la biosynthèse de DHQ en présence d'acide anthranilique exogène, j'ai quantifié la production de DHQ dans la souche JM109 d'E. coli exprimant mvfR (pDN18mvfR) et pqsABC (pLG14) sur deux plamides différents. Nous savions déjà que JM109 portant pDN18mvfR et pqsABCD (pLG12) produit du HHQ, donc que l'expression hétérologue de ce système enzymatique est fonctionnel chez cette espèce (Xiao et al., 2006a). Malheureusement, le DHQ n'a pu être détecté, ce qui suggère que PqsA ne suffit pas à la production de DHQ.

La production de DHQ a également été quantifiée dans les mutants pqsL et pqsH et, comme attendu, celle-ci reste semblable à celle trouvée dans la souche sauvage. PqsL, impliquée dans la biosynthèse du HQNO, et PqsH, impliquée dans la transformation du HHO en POS, ne sont donc pas impliquées dans sa biosynthèse.

Au moment de la publication de l'article, nous avions assumé que l'insertion transpositionnelle dans le mutant pqsB générait une mutation polaire sur tout l'opéron pqsABCDE. Puisque ce mutant produit du DHQ, nous en avions conclu que la protéine PqsA était suffisante pour sa production parmi les enzymes codées par cet opéron. Toutefois, par la suite, il s'est avéré que les insertions transpositionnelles au sein de l'opéron pqsABCDE n'abolissaient pas totalement l'expression des gènes en aval de l'insertion. L'étude des surnageants des différents mutants de l'opéron par LC-MS après 9 h. de culture a montré que le DHQ est absent seulement dans les mutant pqsA et pqsD (Figure). Cette observation suggère que les enzymes PqsA et PqsD sont les seules nécessaires à la production de ces molécules. Ceci fut plus tard confirmé par d'autres travaux portant sur la biosynthèse du DHQ (Zhang et al., 2008). Ces résultats montrent également que les mutations insérées dans l'opéron n'ont pas l'effet polaire attendu. Seuls les mutants non polaires ont été utilisés pour les expériences ultérieures.

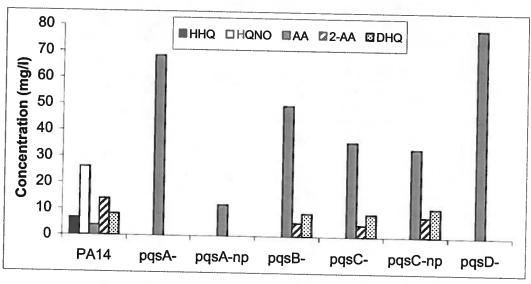


Figure I-1. Production des différents métabolites de l'opéron *pqsABCDE* en présence d'une mutation au sein de celui-ci. Échantillons pris après 9 heures de culture et analysés par LC-MS.

Cinétique de production du DHQ chez Pseudomonas aeruginosa

Afin de quantifier la production de DHQ en fonction de la phase de croissance bactérienne, j'ai réalisé une cinétique de production du DHQ en fonction de la DO_{600} dans la souche sauvage PA14. Celle-ci montre que le DHQ est produit en fin de phase logarithmique et dans des quantités similaires à celles du PQS (Figure).

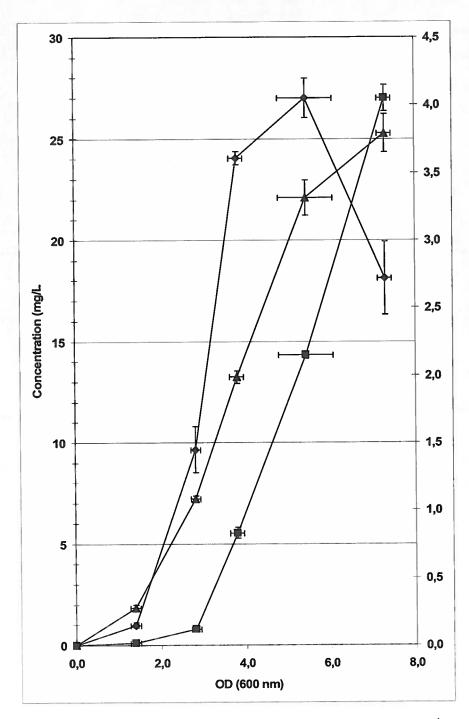


Figure I-2. Production du DHQ (♦), du PQS (■) (axe de gauche) et du HHQ (▲) (axe de droite) dans une culture of *P. aeruginosa* PA14. Résultats d'une moyenne de triplicata (Lépine *et al.*, 2007).

Recherche des précurseurs du DHQ

La structure du DHQ laisse suggérer qu'il dérive d'un acide anthranilique auquel se greffe un groupement acétate. L'ajout d'acide anthranilique tétradeutéré dans une culture de *P. aeruginosa* PA14 fait apparaître du DHQ tétradeutéré, ce qui démontre que l'acide anthranilique est un précurseur du DHQ (Lépine *et al.*, 2007). J'ai cherché l'origine du groupement acétate impliqué dans sa biosynthèse. De nombreuses molécules ont été testées afin de vérifier si leur ajout permet une augmentation de la production de DHQ, en présence d'un excès d'acide anthranilique. Ces tests ont été réalisés dans un mutant *pqsB*⁻. Celui-ci ne peut plus produire de HHQ ou de PQS, mais synthétise encore le DHQ. En absence de la protéine PqsB, plus d'acide anthranilique est donc disponible pour produire du DHQ. Une culture bactérienne de ce mutant a été incubée avec 50 mg/l de différents précurseurs potentiels (voir Tableau) ajoutés dans le milieu de culture après deux heures de croissance bactérienne. La production de DHQ a été analysée en fin de phase logarithmique. Aucune de ces molécules n'a permis d'obtenir une plus grande quantité de DHQ (voir (Lépine *et al.*, 2007), en Appendice E). Elles ne sont donc pas l'un des précurseurs du DHQ.

Tableau I-1. Liste des précurseurs hypothétiques du DHQ testés.

Nom du produit testé	Concentration ajoutée aux cultures (mg/l)
Skatole (3-méthyl indole)	100
indole	100
N-formyl 2-amino acétophénone	100
2-amino acétophénone	100
tryptophane	100
4-Hydroxyquinoline	100
Indole acide acétique	100
Acide kynurénique	50

Rôle du DHQ

Le rôle biologique du DHQ n'a pas encore été mis à jour. De nombreuses expériences ont été réalisées lors de la préparation de l'article portant sur le DHQ (Lépine et al., 2007), mais n'ont pas permis de déterminer la fonction biologique de cette molécule. Il n'intervient pas dans la régulation de la transcription de l'opéron pqsABCDE, ni dans la production subséquente des HAQ. Il n'affecte pas non plus la production de pyocyanine et aucune activité antimicrobienne n'a pu être mise à jour (Lépine et al., 2007). D'autres chercheurs ont toutefois rapporté que le DHQ diminue la viabilité des cellules épithéliales des poumons chez la souris, lui conférant un rôle dans la pathogénicité de P. aeruginosa (Zhang et al., 2008).

Références bibliographiques

Abremski, K. & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259, 1509-1514.

Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. & Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148, 2371-2381.

Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3928-3935.

Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A. & Storz, G. (1998). The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J* 17, 6069-6075.

Altuvia, S. (2007). Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Curr Opin Microbiol* 10, 257-261.

Alvarez-Ortega, C. & Harwood, C. S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* 65, 153-165.

Anderson, R. M., Zimprich, C. A. & Rust, L. (1999). A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J Bacteriol* 181, 6264-6270.

Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. & Altuvia, S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. Curr Biol 11, 941-950.

Austin, M. B. & Noel, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* 20, 79-110.

Bailey, J. & Manoil, C. (2002). Genome-wide internal tagging of bacterial exported proteins. *Nat Biotechnol* 20, 839-842.

Baron, S. S. & Rowe, J. J. (1981). Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother* 20, 814-820.

Baudin, B. (2002). New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. Clin Chem Lab Med 40, 256-265.

- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Sargent, J. L., Levesque, R. C. & Mattick, J. S. (2002a). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 3605-3613.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Semmler, A. B. & Mattick, J. S. (2002b). Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 3598-3604.
- Bebrone, C. (2007). Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74, 1686-1701.
- Becher, A. & Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques* 29, 948-950, 952.
- Bejerano-Sagie, M. & Xavier, K. B. (2007). The role of small RNAs in quorum sensing. Curr Opin Microbiol 10, 189-198.
- Benito, Y., Kolb, F. A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J. & Vandenesch, F. (2000). Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* 6, 668-679.
- Bera, A. K., Atanasova, V., Robinson, H., Eisenstein, E., Coleman, J. P., Pesci, E. C. & Parsons, J. F. (2009). Structure of PqsD, a *Pseudomonas* quinolone signal biosynthetic enzyme, in complex with anthranilate. *Biochemistry* 48, 8644-8655.
- Beyer, W., Imlay, J. & Fridovich, I. (1991). Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40, 221-253.
- Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R. & Gotz, F. (2009). Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75, 6910-6912.
- **Bjarnsholt, T. & Givskov, M. (2007).** Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **362**, 1213-1222.
- Bjorn, M. J., Sokol, P. A. & Iglewski, B. H. (1979). Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Bacteriol* 138, 193-200.
- Bochner, B. R., Gadzinski, P. & Panomitros, E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* 11, 1246-1255.

- **Bochner, B. R. (2003).** New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet* **4**, 309-314.
- Boeke, J. D., LaCroute, F. & Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* 197, 345-346.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A. C., Benito, Y., Jacquier, A., Gaspin, C., Vandenesch, F. & Romby, P. (2007). Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. Genes Dev 21, 1353-1366.
- Bokhove, M., Nadal Jimenez, P., Quax, W. J. & Dijkstra, B. W. (2010). The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 686-691.
- Boschi, L., Mercuri, P. S., Riccio, M. L., Amicosante, G., Galleni, M., Frere, J. M. & Rossolini, G. M. (2000). The Legionella (Fluoribacter) gormanii metallo-beta-lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 44, 1538-1543.
- **Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bradley, D. E. (1974). The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophages to a host mutant with nonretractile pili. *Virology* 58, 149-163.
- Branny, P., Pearson, J. P., Pesci, E. C., Kohler, T., Iglewski, B. H. & Van Delden, C. (2001). Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa dksA* homologue. *J Bacteriol* 183, 1531-1539.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R. & Haussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol* 187, 3630-3635.
- Bredenbruch, F., Geffers, R., Nimtz, M., Buer, J. & Haussler, S. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* 8, 1318-1329.
- Brencic, A. & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 72, 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L. & Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas*

- aeruginosa acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. Mol Microbiol 73, 434-445.
- Brett, P. J., DeShazer, D. & Woods, D. E. (1998). Burkholderia thailandensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 1, 317-320.
- Brint, J. M. & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177, 7155-7163.
- Brown, S. M., Howell, M. L., Vasil, M. L., Anderson, A. J. & Hassett, D. J. (1995). Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 177, 6536-6544.
- Bundy, B. M., Campbell, A. L. & Neidle, E. L. (1998). Similarities between the antABC-encoded anthranilate dioxygenase and the benABC-encoded benzoate dioxygenase of Acinetobacter sp. strain ADP1. J Bacteriol 180, 4466-4474.
- Buttner, D. & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. FEMS Microbiol Rev 34, 107-133.
- Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G. B., Andremont, A. & Ruimy, R. (2003). Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 7222-7230.
- Calfee, M. W., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas* aeruginosa. Proc Natl Acad Sci USA 98, 11633-11637.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. & Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14613-14618.
- Carty, N. L., Layland, N., Colmer-Hamood, J. A., Calfee, M. W., Pesci, E. C. & Hamood, A. N. (2006). PtxR modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Mol Microbiol* 61, 782-794.
- Castang, S., McManus, H. R., Turner, K. H. & Dove, S. L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18947-18952.

- Chabot, F., Mitchell, J. A., Gutteridge, J. M. & Evans, T. W. (1998). Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J* 11, 745-757.
- Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F. & Bentley, W. E. (2005). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* 6, 115.
- Chen, S., Lesnik, E. A., Hall, T. A., Sampath, R., Griffey, R. H., Ecker, D. J. & Blyn, L. B. (2002). A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome. *Biosystems* 65, 157-177.
- Chivian, D., Kim, D. E., Malmstrom, L., Bradley, P., Robertson, T., Murphy, P., Strauss, C. E., Bonneau, R., Rohl, C. A. & Baker, D. (2003). Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server. *Proteins* 53 Suppl 6, 524-533.
- Choi, K. H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64, 391-397.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. & Greenberg, E. P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2752-2757.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* 3, 541-548.
- Coenye, T., Schouls, L. M., Govan, J. R., Kersters, K. & Vandamme, P. (1999). Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4, 1657-1666.
- Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5, 719-729.
- Coleman, J. P., Hudson, L. L., McKnight, S. L., Farrow, J. M., 3rd, Calfee, M. W., Lindsey, C. A. & Pesci, E. C. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J Bacteriol* 190, 1247-1255.
- Collier, D. N., Anderson, L., McKnight, S. L., Noah, T. L., Knowles, M., Boucher, R., Schwab, U., Gilligan, P. & Pesci, E. C. (2002). A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 215, 41-46.
- Cormack, R. S., Genereaux, J. L. & Mackie, G. A. (1993). RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the ams/rne/hmp1 gene product. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 9006-9010.

- Cornforth, J. W. & James, A. T. (1956). Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. *Biochem J* 63, 124-130.
- Crawford, I. P. (1975). Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol Rev* 39, 87-120.
- Crawford, I. P., Wilde, A., Yelverton, E. M., Figurski, D. & Hedges, R. W. (1986). Structure and regulation of the anthranilate synthase genes in *Pseudomonas aeruginosa*: II. Cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 3, 449-458.
- Czajkowski, R. & Jafra, S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica* 56, 1-16.
- **D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B. & Pesci, E. C. (2002).** Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**, 6481-6489.
- D'Argenio, D. A., Wu, M., Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Déziel, E., Smith, E. E., Nguyen, H., Ernst, R. K., Larson Freeman, T. J., Spencer, D. H., Brittnacher, M., Hayden, H. S., Selgrade, S., Klausen, M., Goodlett, D. R., Burns, J. L., Ramsey, B. W. & Miller, S. I. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* 64, 512-533.
- Daigle, F., Graham, J. E. & Curtiss, R., 3rd (2001). Identification of Salmonella typhi genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Mol Microbiol 41, 1211-1222.
- Daigle, F., Hou, J. Y. & Clark-Curtiss, J. E. (2002). Microbial gene expression elucidated by Selective Capture of Transcribed Sequences (SCOTS). *Methods in enzymology* 358, 108-122.
- Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y. & Toh, H. (2001). Expansion of the zinc metallohydrolase family of the beta-lactamase fold. FEBS Lett 503, 1-6.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28, 261-289.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 2175-2184.
- de Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849.

- de Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol Lett* 212, 101-106.
- de Paiva, A., Ashton, A. C., Foran, P., Schiavo, G., Montecucco, C. & Dolly, J. O. (1993). Botulinum A like type B and tetanus toxins fulfils criteria for being a zinc-dependent protease. *J Neurochem* 61, 2338-2341.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. & Bossier, P. (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from *in vivo* work. *ISME J* 2, 19-26.
- **Dekimpe, V. & Déziel, E. (2009).** Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* **155**, 712-723.
- Denervaud, V., TuQuoc, P., Blanc, D., Favre-Bonte, S., Krishnapillai, V., Reimmann, C., Haas, D. & van Delden, C. (2004). Characterization of cell-to-cell signaling-deficient *Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients. *J Clin Microbiol* 42, 554-562.
- Deng, Y., Wu, J., Eberl, L. & Zhang, L. H. (2010). Structural and functional characterization of diffusible signal factor family quorum-sensing signals produced by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol* 76, 4675-4683.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1339-1344.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. & Rahme, L. G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55, 998-1014.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61, 1308-1321.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of Nacylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184, 2576-2586.

- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50, 29-43.
- Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P. & Camara, M. (2006a). 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* 296, 83-91.
- Diggle, S. P., Lumjiaktase, P., Dipilato, F., Winzer, K., Kunakorn, M., Barrett, D. A., Chhabra, S. R., Camara, M. & Williams, P. (2006b). Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol* 13, 701-710.
- Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Camara, M. & Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* 14, 87-96.
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M. & Granger-Schnarr, M. (1998). A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257, 205-212.
- **Dominski, Z. (2007).** Nucleases of the metallo-beta-lactamase family and their role in DNA and RNA metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 67-93.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3526-3531.
- Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 43 Spec No, 101-109.
- Dove, S. L. & Hochschild, A. (2004). A bacterial two-hybrid system based on transcription activation. *Methods Mol Biol* 261, 231-246.
- Duchene, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B. U. & Domdey, H. (1988). Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. *J Bacteriol* 170, 155-162.
- **Eberl, L. & Tummler, B. (2004).** Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. Int J Med Microbiol **294**, 123-131.

- Egland, K. A. & Greenberg, E. P. (1999). Quorum sensing in Vibrio fischeri: elements of the luxl promoter. Mol Microbiol 31, 1197-1204.
- Engel, J. & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12, 61-66.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. & Crawford, I. P. (1990a). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172, 884-900.
- Essar, D. W., Eberly, L., Han, C. Y. & Crawford, I. P. (1990b). DNA sequences and characterization of four early genes of the tryptophan pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 172, 853-866.
- Evans, W. C. (1963). The Microbiological Degradation of Aromatic Compounds. *J Gen Microbiol* 32, 177-184.
- Even, S., Pellegrini, O., Zig, L., Labas, V., Vinh, J., Brechemmier-Baey, D. & Putzer, H. (2005). Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic Acids Res* 33, 2141-2152.
- Fadeeva, M. S., Nunez, C., Bertsova, Y. V., Espin, G. & Bogachev, A. V. (2008). Catalytic properties of Na+-translocating NADH:quinone oxidoreductases from Vibrio harveyi, Klebsiella pneumoniae, and Azotobacter vinelandii. FEMS Microbiol Lett 279, 116-123.
- Farrow, J. M., 3rd & Pesci, E. C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* 189, 3425-3433.
- Farrow, J. M., 3rd, Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2008). PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J Bacteriol* 190, 7043-7051.
- Fedor, L. R. & Bruice, T. C. (1964). Nucleophilic displacement reactions at the thiol ester bond. II. Hydrazinolysis and morpholinolysis in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* 86, 4117-4123.
- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* 6, 775-784.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. & Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38, D211-222.

- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26, 251-259.
- Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. Canadian Journal of Microbiology 23, 1-6.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F. & Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369-22376.
- Freck-O'Donnell, L. C. & Darzins, A. (1993). Pseudomonas aeruginosa lasA gene: determination of the transcription start point and analysis of the promoter/regulatory region. Gene 129, 113-117.
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* 52, 385-406.
- Frommberger, M., Hertkorn, N., Englmann, M., Jakoby, S., Hartmann, A., Kettrup, A. & Schmitt-Kopplin, P. (2005). Analysis of *N*-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion-exchange solid-phase extraction by capillary zone electrophoresismass spectrometry. *Electrophoresis* 26, 1523-1532.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol*.
- Fuqua, C. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J Bacteriol* 188, 3169-3171.
- 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, 269-275.
- Gallagher, L. A. & Manoil, C. (2001). Pseudomonas aeruginosa PAO1 kills Caenorhabditis elegans by cyanide poisoning. J Bacteriol 183, 6207-6214.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 6472-6480.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173, 3000-3009.

- Garau, G., Di Guilmi, A. M. & Hall, B. G. (2005). Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2778-2784.
- Gardner, P. R. (1996). Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells. *Arch Biochem Biophys* 333, 267-274.
- Gomes, C. M., Frazao, C., Xavier, A. V., Legall, J. & Teixeira, M. (2002). Functional control of the binuclear metal site in the metallo-beta-lactamase-like fold by subtle amino acid replacements. *Protein Sci* 11, 707-712.
- Gonzalez, N., Heeb, S., Valverde, C., Kay, E., Reimmann, C., Junier, T. & Haas, D. (2008). Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. *BMC Genomics* 9, 167.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A. & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 23, 249-259.
- Goulian, M. (2004). Robust control in bacterial regulatory circuits. *Curr Opin Microbiol* 7, 198-202.
- Graham, J. E. & Clark-Curtiss, J. E. (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11554-11559.
- Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D. & Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxidegenerating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6181-6185.
- Guina, T., Purvine, S. O., Yi, E. C., Eng, J., Goodlett, D. R., Aebersold, R. & Miller, S. I. (2003). Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2771-2776.
- Haas, D., Keel, C. & Reimmann, C. (2002). Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 385-395.
- Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tummler, B., Heinz, D. W. & Schubert, W. D. (2006). The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7631-7636.

- Hamood, A. N., Griswold, J. & Colmer, J. (1996). Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 3154-3160.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanson, S. R., Best, M. D. & Wong, C. H. (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 5736-5763.
- Hasegawa, N., Arai, H. & Igarashi, Y. (2003). Need for cytochrome bc1 complex for dissimilatory nitrite reduction of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 121-126.
- Hassan, H. M. & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol* 141, 156-163.
- Hassett, D. J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D. E. & Cohen, M. S. (1992). Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun* 60, 328-336.
- Hassett, D. J., Woodruff, W. A., Wozniak, D. J., Vasil, M. L., Cohen, M. S. & Ohman, D. E. (1993). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J Bacteriol* 175, 7658-7665.
- Hassett, D. J., Schweizer, H. P. & Ohman, D. E. (1995). Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. J Bacteriol 177, 6330-6337.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7, 654-665.
- Haussler, S. & Becker, T. (2008). The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *PLoS Pathog* 4, e1000166.
- Hazan, R., He, J., Xiao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Astrakas, C., Déziel, E., Lépine, F. & Rahme, L. G. (2010). Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence. *PLoS Pathog* 6, e1000810.
- He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J. & Fuqua, C. (2003). Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* 185, 809-822.

- Heath, R. J. & Rock, C. O. (2002). The Claisen condensation in biology. Nat Prod Rep 19, 581-596.
- Hendrickson, E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2001). Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *rpoN* gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* 183, 7126-7134.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373-395, table of contents.
- Henle, E. S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y. & Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe2+-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* 274, 962-971.
- Hentzer, M. & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112, 1300-1307.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. & Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J* 22, 3803-3815.
- Heurlier, K., Denervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C. & Haas, D. (2003). Negative control of quorum sensing by RpoN (sigma54) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 2227-2235.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77-86.
- Hoang, T. T., Kutchma, A. J., Becher, A. & Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43, 59-72.
- Hoffman, L. R., Deziel, E., D'Argenio, D. A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R. L., Ramsey, B. W. & Miller, S. I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19890-19895.
- Hokii, Y., Kubo, A., Ogasawara, T., Nogi, Y., Taneda, A., Arai, R., Muto, A. & Ushida, C. (2006). Twelve novel *C. elegans* RNA candidates isolated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Gene* 365, 83-87.

- Holden, I., Swift, I. & Williams, I. (2000). New signal molecules on the quorum-sensing block. *Trends Microbiol* 8, 101-104; discussion 103-104.
- Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S. & Williams, P. (1999). Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 33, 1254-1266.
- Holloway, B. W. (1969). Genetics of Pseudomonas. Bacteriol Rev 33, 419-443.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., Silverman, J. M., Ohlson, B. B., Hicks, K. G., Plemel, R. L., Li, M., Schwarz, S., Wang, W. Y., Merz, A. J., Goodlett, D. R. & Mougous, J. D. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25-37.
- Hooi, D. S., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Williams, P. & Pritchard, D. I. (2004). Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* 72, 6463-6470.
- Hooper, D. C. (1999). Mode of action of fluoroquinolones. Drugs 58 Suppl 2, 6-10.
- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H. & Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of acylhomoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 69, 5941-5949.
- Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M. & Leadbetter, J. R. (2006). Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 72, 1190-1197.
- Humair, B., Gonzalez, N., Mossialos, D., Reimmann, C. & Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *ISME J* 3, 955-965.
- Imlay, J. A. & Linn, S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 169, 2967-2976.
- Imlay, J. A. & Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 240, 1302-1309.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77, 755-776.

- Ip, M., Osterberg, L. G., Chau, P. Y. & Raffin, T. A. (1995). Pulmonary melioidosis. Chest 108, 1420-1424.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenthner, D., Bovee, D., Olson, M. V. & Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14339-14344.
- James, A. L., Perry, J. D., Chilvers, K., Robson, I. S., Armstrong, L. & Orr, K. E. (2000). Alizarin-beta-D-galactoside: a new substrate for the detection of bacterial beta-galactosidase. *Lett Appl Microbiol* 30, 336-340.
- Jang, S. & Imlay, J. A. (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J Biol Chem* 282, 929-937.
- Jensen, V., Lons, D., Zaoui, C., Bredenbruch, F., Meissner, A., Dieterich, G., Munch, R. & Haussler, S. (2006). RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol* 188, 8601-8606.
- Jewes, L. A. & Spencer, R. C. (1990). The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 31, 271-274.
- 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, 2477-2482.
- Jude, F., Kohler, T., Branny, P., Perron, K., Mayer, M. P., Comte, R. & van Delden, C. (2003). Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 3558-3566.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A. S., von Gotz, F., Steinmetz, I., Eberl, L. & Tummler, B. (2004). Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150, 831-841.
- **Juhas, M., Eberl, L. & Tummler, B. (2005).** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**, 459-471.
- Jung, I. L. & Kim, I. G. (2003). Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 915-922.
- Kadurugamuwa, J. L. & Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth

and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* 177, 3998-4008.

Kadurugamuwa, J. L. & Beveridge, T. J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* 40, 615-621.

Kalapos, M. P. (1999). Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 110, 145-175.

Kaminsky, D. & Meltzer, R. I. (1968). Quinolone antibacterial agents. Oxolinic acid and related compounds. *J Med Chem* 11, 160-163.

Kaneko, T., Tanaka, N. & Kumasaka, T. (2005). Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci* 14, 558-565.

Karatan, E., Duncan, T. R. & Watnick, P. I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol* 187, 7434-7443.

Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. & Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 6026-6033.

Keyer, K. & Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13635-13640.

Kiely, P. D., O'Callaghan, J., Abbas, A. & O'Gara, F. (2008). Genetic analysis of genes involved in dipeptide metabolism and cytotoxicity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **154**, 2209-2218.

King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44, 301-307.

Kingsford, C. L., Ayanbule, K. & Salzberg, S. L. (2007). Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol* 8, R22.

Kobayashi, K. & Tagawa, S. (2004). Activation of SoxR-dependent transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem (Tokyo)* 136, 607-615.

Kogut, M. & Lightbown, J. W. (1962). Selective inhibition by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide of certain oxidation-reduction reactions. *Biochem J* 84, 368-382.

- Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M. & Pechere, J. C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 5213-5222.
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Indulkar, S. D., Del Puerto, A., Koh, C. L., Hoiby, N. & Mathee, K. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4567-4575.
- Korshunov, S. & Imlay, J. A. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 6326-6334.
- Koskenkorva, T., Aro-Karkkainen, N., Bachmann, D., Arai, H., Frey, A. D. & Kallio, P. T. (2008). Transcriptional activity of *Pseudomonas aeruginosa fhp* promoter is dependent on two regulators in addition to FhpR. *Arch Microbiol* 189, 385-396.
- Kuehn, M. J. & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 19, 2645-2655.
- Kulkarni, R. V. & Kulkarni, P. R. (2007). Computational approaches for the discovery of bacterial small RNAs. *Methods* 43, 131-139.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T. & Osterman, A. (2003). Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett* 227, 219-227.
- Kwakman, P. H., Te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB J.*
- Lacey, S. L., Mehmet, S. & Taylor, G. W. (1995). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by 4-hydroxy-2-alkyl-quinolines produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **36**, 827-831.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 67, 241-253.
- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A. & Williams, P. (1995). Multiple homologues of LuxR and Luxl control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17, 333-343.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21, 1137-1146.

- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10, 599-606.
- Laursen, J. B. & Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev* 104, 1663-1686.
- Lawrence, J. W., Darkin-Rattray, S., Xie, F., Neims, A. H. & Rowe, T. C. (1993). 4-Quinolones cause a selective loss of mitochondrial DNA from mouse L1210 leukemia cells. *J Cell Biochem* 51, 165-174.
- Ledgham, F., Soscia, C., Chakrabarty, A., Lazdunski, A. & Foglino, M. (2003a). Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res Microbiol* 154, 207-213.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. & Lazdunski, A. (2003b). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* 48, 199-210.
- Lee, J.-H. (2005). Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol*.
- Lee, J. H., Lequette, Y. & Greenberg, E. P. (2006). Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol* 59, 602-609.
- Lee, X., Fox, A., Sufrin, J., Henry, H., Majcherczyk, P., Haas, D. & Reimmann, C. (2010). Identification of the Biosynthetic Gene Cluster for the *Pseudomonas aeruginosa* Antimetabolite L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butenoic Acid. *J Bacteriol*.
- Lehavi, O., Aizenstien, O., Katz, L. H. & Hourvitz, A. (2002). [Glanders--a potential disease for biological warfare in humans and animals]. *Harefuah* 141 Spec No, 88-91, 119.
- Leisinger, T. & Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev* 43, 422-442.
- Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. (2004). The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118, 69-82.
- Lenz, D. H., Miller, M. B., Zhu, J., Kulkarni, R. V. & Bassler, B. L. (2005). CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 58, 1186-1202.

- Lépine, F., Déziel, E., Milot, S. & Rahme, L. G. (2003). A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* 1622, 36-41.
- Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J. & Rahme, L. G. (2004). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Soc Mass Spectrom* 15, 862-869.
- Lépine, F., Dekimpe, V., Lesic, B., Milot, S., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rahme, L. G. & Deziel, E. (2007). PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*. *Biol Chem* 388, 839-845.
- Lequette, Y., Lee, J. H., Ledgham, F., Lazdunski, A. & Greenberg, E. P. (2006). A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* 188, 3365-3370.
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M. H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A. A., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog* 3, 1229-1239.
- Lesic, B. & Rahme, L. G. (2008). Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol* 9, 20.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R. & Rahme, L. G. (2009). Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155, 2845-2855.
- Lesnik, E. A., Sampath, R., Levene, H. B., Henderson, T. J., McNeil, J. A. & Ecker, D. J. (2001). Prediction of rho-independent transcriptional terminators in *Escherichia coli. Nucleic Acids Res* 29, 3583-3594.
- Lesprit, P., Faurisson, F., Join-Lambert, O., Roudot-Thoraval, F., Foglino, M., Vissuzaine, C. & Carbon, C. (2003). Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1478-1482.
- Li, L. L., Malone, J. E. & Iglewski, B. H. (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol* 189, 4367-4374.
- Liang, H., Li, L., Dong, Z., Surette, M. G. & Duan, K. (2008). The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J Bacteriol* 190, 6217-6227.

- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2833-2838.
- **Lightbown, J. W. (1954).** An antagonist of streptomycin and dihydrostreptomycin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **11**, 477-492.
- **Lightbown, J. W. & Jackson, F. L. (1956).** Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochem J* 63, 130-137.
- Lilley, B. N. & Bassler, B. L. (2000). Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol Microbiol* 36, 940-954.
- Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R. K. & Cook, G. M. (2000). Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 23-31.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P. & Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272, 17502-17510.
- Livny, J., Brencic, A., Lory, S. & Waldor, M. K. (2006). Identification of 17 Pseudomonas aeruginosa sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2. Nucleic Acids Res 34, 3484-3493.
- Livny, J. & Waldor, M. K. (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. Curr Opin Microbiol 10, 96-101.
- Loh, J., Pierson, E. A., Pierson, L. S., 3rd, Stacey, G. & Chatterjee, A. (2002). Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5, 285-290.
- Lynch, S. V. & Wiener-Kronish, J. P. (2008). Novel strategies to combat bacterial virulence. Curr Opin Crit Care 14, 593-599.
- Ma, J. F., Ochsner, U. A., Klotz, M. G., Nanayakkara, V. K., Howell, M. L., Johnson, Z., Posey, J. E., Vasil, M. L., Monaco, J. J. & Hassett, D. J. (1999). Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 3730-3742.
- Machan, Z. A., Pitt, T. L., White, W., Watson, D., Taylor, G. W., Cole, P. J. & Wilson, R. (1991). Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus:* description of an anti-staphylococcal substance. *J Med Microbiol* 34, 213-217.

Machan, Z. A., Taylor, G. W., Pitt, T. L., Cole, P. J. & Wilson, R. (1992). 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 30, 615-623.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.

Majtan, V. & Majtanova, L. (1998). Postantibiotic effect of some antibiotics on the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. J Basic Microbiol 38, 221-227.

Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P. & Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145 (Pt 2), 283-291.

Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 148, 1119-1127.

Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V. & Xu, Y. (2009). DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* 37, D459-463.

Markees, D. G., Schwab, L. S. & Vegotsky, A. (1974). Synthesis and antibacterial activity of some substituted 4-quinolone-3-carboxylic acids. *J Med Chem* 17, 137-139.

Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H. & Bachofen, R. (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol* 4, 25.

Martinez, A. & Kolter, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* 179, 5188-5194.

Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K. & Whiteley, M. (2008). Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* 69, 491-502.

Mashburn, L. M. & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437, 422-425.

Massé, E. & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4620-4625.

- Massey, V. (1995). Introduction: flavoprotein structure and mechanism. FASEB J 9, 473-475.
- Matsuno-Yagi, A. & Hatefi, Y. (1996). Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. The redox reactions of the bis-heme cytochrome b in ubiquinone-sufficient and ubiquinone-deficient systems. *J Biol Chem* 271, 6164-6171.
- Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M. & Thomashow, L. S. (1998). A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* 180, 2541-2548.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183, 6454-6465.
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143 (Pt 12), 3703-3711.
- McGrath, S., Wade, D. S. & Pesci, E. C. (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* 230, 27-34.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 2702-2708.
- Medina, G., Juarez, K., Diaz, R. & Soberon-Chavez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149, 3073-3081.
- Medina, G., Juarez, K. & Soberon-Chavez, G. (2003b). The *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* 185, 377-380.
- Medina, G., Juarez, K., Valderrama, B. & Soberon-Chavez, G. (2003c). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* 185, 5976-5983.
- Metzger, D. & Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10, 470-476.

- Miller, F. (1972). Glycopeptides of human immunoglobulins. 3. The use and preparation of specific glycosidases. *Immunochemistry* 9, 217-228.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 55, 165-199.
- Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. (2008). Positive feedback in cellular control systems. *Bioessays* 30, 542-555.
- Morgan, J. E., Blankenship, J. W. & Matthews, H. R. (1987). Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles. *Biochemistry* 26, 3643-3649.
- Neidhardt, F. C. & Umbarger, H. E. (1996). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D C, 13.
- Nouwens, A. S., Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Walsh, B. J., Schweizer, H. P., Mattick, J. S. & Cordwell, S. J. (2003). Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 149, 1311-1322.
- Nunn, D., Bergman, S. & Lory, S. (1990). Products of three accessory genes, pilB, pilC, and pilD, are required for biogenesis of Pseudomonas aeruginosa pili. J Bacteriol 172, 2911-2919.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176, 2044-2054.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6424-6428.
- Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. & Hassett, D. J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J Bacteriol* 182, 4533-4544.
- Ochsner, U. A., Hassett, D. J. & Vasil, M. L. (2001). Genetic and physiological characterization of *ohr*, encoding a protein involved in organic hydroperoxide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 773-778.
- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* 45, 1277-1287.

- Oglesby, A. G., Farrow, J. M., 3rd, Lee, J. H., Tomaras, A. P., Greenberg, E. P., Pesci, E. C. & Vasil, M. L. (2008). The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* 283, 15558-15567.
- Oinonen, C. & Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci* 9, 2329-2337.
- Olson, E. R., Dunyak, D. S., Jurss, L. M. & Poorman, R. A. (1991). Identification and characterization of *dppA*, an *Escherichia coli* gene encoding a periplasmic dipeptide transport protein. *J Bacteriol* 173, 234-244.
- Palma, M., DeLuca, D., Worgall, S. & Quadri, L. E. (2004). Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 186, 248-252.
- Palma, M., Zurita, J., Ferreras, J. A., Worgall, S., Larone, D. H., Shi, L., Campagne, F. & Quadri, L. E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun* 73, 2958-2966.
- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K. & Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol* 187, 5267-5277.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W. & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. Cell 118, 311-322.
- **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**, 5756-5767.
- **Perret, J. L. (1997).** [Melioidosis: a tropical time bomb that is spreading]. *Med Trop (Mars)* **57**, 195-201.
- Perwez, T. & Kushner, S. R. (2006). RNase Z in Escherichia coli plays a significant role in mRNA decay. Mol Microbiol 60, 723-737.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3127-3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11229-11234.

- **Pessi, G. & Haas, D. (2000).** Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 6940-6949.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 183, 6676-6683.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F. & Baquero, F. (1987). Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* 20, 631-638.
- Platt, M. D., Schurr, M. J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., Levesque, R. C., Fedynak, A., Brinkman, F. S., Schurr, J., Hwang, S. H., Lau, G. W., Limbach, P. A., Rowe, J. J., Lieberman, M. A., Barraud, N., Webb, J., Kjelleberg, S., Hunt, D. F. & Hassett, D. J. (2008). Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. *J Bacteriol* 190, 2739-2758.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. & Newman, D. K. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* 2, 71-78.
- Prince, R. W., Storey, D. G., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1991). Regulation of toxA and regA by the Escherichia coli fur gene and identification of a Fur homologue in Pseudomonas aeruginosa PA103 and PA01. Mol Microbiol 5, 2823-2831.
- Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S. H., Cockayne, A., Hill, P., O'Shea, P., Chhabra, S. R., Camara, M. & Williams, P. (2006). N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74, 910-919.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.
- Rahme, L. G., Tan, M. W., Le, L., Wong, S. M., Tompkins, R. G., Calderwood, S. B. & Ausubel, F. M. (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13245-13250.
- Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L. & Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8815-8821.

- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., Zennaro, E. & Leoni, L. (2007). RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 66, 1557-1565.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Zennaro, E. & Leoni, L. (2009). Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 301, 210-217.
- Rampioni, G., Pustelny, C., Fletcher, M. P., Wright, V. J., Bruce, M., Rumbaugh, K. P., Heeb, S., Camara, M. & Williams, P. (2010). Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ Microbiol*.
- Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, A. N., Iglewski, B. H. & Kornberg, A. (2000). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9636-9641.
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T., Phipps, R. K., Christensen, K. B., Jensen, P. O., Andersen, J. B., Koch, B., Larsen, T. O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N. & Givskov, M. (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151, 1325-1340.
- Ravn, L., Christensen, A. B., Molin, S., Givskov, M. & Gram, L. (2001). Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Methods* 44, 239-251.
- **Records, A. R. & Gross, D. C. (2010).** Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. *J Bacteriol* **192**, 3584-3596.
- Reichenbach, B., Maes, A., Kalamorz, F., Hajnsdorf, E. & Gorke, B. (2008). The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of glmS expression and is subject to regulation by polyadenylation in Escherichia coli. Nucleic Acids Res 36, 2570-2580.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 24, 309-319.

- Reva, O. N., Weinel, C., Weinel, M., Bohm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J. D. & Tummler, B. (2006). Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 188, 4079-4092.
- Revel, H. R. (1981). Organization of the bacteriophage T4 tail fiber gene cluster 34-38. *Prog Clin Biol Res* 64, 353-364.
- Richardson, J., Stead, D. E., Elphinstone, J. G. & Coutts, R. H. (2002). Diversity of Burkholderia isolates from woodland rhizosphere environments. J Appl Microbiol 93, 616-630.
- Ridderstrom, M. & Mannervik, B. (1997). Molecular cloning and characterization of the thiolesterase glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 322 (Pt 2), 449-454.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147, 3249-3262.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L. & Mekalanos, J. J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 8006-8011.
- Ritter, C. & Luckner, M. (1971). [Biosynthesis of 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline derivates (pseudane) in *Pseudomonas aeruginosa*]. Eur J Biochem 18, 391-400.
- Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. & Beckwith, J. (2000). Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 2505-2512.
- Roche, D. M., Byers, J. T., Smith, D. S., Glansdorp, F. G., Spring, D. R. & Welch, M. (2004). Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* 150, 2023-2028.
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., Serisier, D. J., Hockey, P. M., Jones, G. & Bruce, K. D. (2004). characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 42, 5176-5183.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. & Brun-Zinkernagel, A. M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175, 4744-4755.

- Rose, D., Hertel, J., Reiche, K., Stadler, P. F. & Hackermuller, J. (2008). NcDNAlign: plausible multiple alignments of non-protein-coding genomic sequences. *Genomics* 92, 65-74.
- Royt, P. W., Honeychuck, R. V., Ravich, V., Ponnaluri, P., Pannell, L. K., Buyer, J. S., Chandhoke, V., Stalick, W. M., DeSesso, L. C., Donohue, S., Ghei, R., Relyea, J. D. & Ruiz, R. (2001). 4-hydroxy-2-nonylquinoline: a novel iron chelator isolated from a bacterial cell membrane. *Bioorg Chem* 29, 387-397.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H. & Hamood, A. N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 67, 5854-5862.
- Rust, L., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1996). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J Bacteriol* 178, 1134-1140.
- Ruzicka, S. (1899). Vergleichende Studien über den Bacillus pyocyaneus und den Bacillus fluorescens liquefaciens. Archiv for Hygiene 34, 149-177.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Garcia, B. F., Watt, S. A., Niehaus, K., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2008). Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 68, 75-86.
- Salunkhe, P., Topfer, T., Buer, J. & Tummler, B. (2005). Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 187, 2565-2572.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M. & Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15876-15881.
- Sarkozy, G. (2001). Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Veterinary Medicine* 9-10, 257-274.
- 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, 463-476.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47, 597-626.

- Schneider, A. & Marahiel, M. A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Arch Microbiol 169, 404-410.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185, 2066-2079.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004a). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* 51, 973-985.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. & Greenberg, E. P. (2004b). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15833-15839.
- Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem* 279, 48742-48750.
- Seed, P. C., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177, 654-659.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O. & Margalit, H. (2007). Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Mol Syst Biol* 3, 138.
- Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P. & Williams, S. C. (2005). Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29, 935-947.
- Sibley, C. D., Duan, K. M., Fischer, C., Parkins, M. D., Storey, D. G., Rabin, H. R. & Surette, M. G. (2008). Discerning the Complexity of Community Interactions Using a Drosophila Model of Polymicrobial Infections. Plos Pathogens 4, -.
- Siehnel, R., Traxler, B., An, D. D., Parsek, M. R., Schaefer, A. L. & Singh, P. K. (2010). A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7916-7921.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnology* 1, 784-791.

- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P. & Quax, W. J. (2006). Quorum quenching by an N-acylhomoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74, 1673-1682.
- Smith, R. S., Harris, S. G., Phipps, R. & Iglewski, B. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* 184, 1132-1139.
- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003). P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 6, 56-60.
- Soberon-Chavez, G., Aguirre-Ramirez, M. & Ordonez, L. (2005). Is Pseudomonas aeruginosa only "sensing quorum"? Crit Rev Microbiol 31, 171-182.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K. E. & Blasi, U. (2003). Reduced virulence of a hfq mutant of Pseudomonas aeruginosa O1. Microb Pathog 35, 217-228.
- Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E. P. & Blasi, U. (2006). Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 59, 1542-1558.
- Sonnleitner, E., Sorger-Domenigg, T., Madej, M. J., Findeiss, S., Hackermuller, J., Huttenhofer, A., Stadler, P. F., Blasi, U. & Moll, I. (2008). Detection of small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by RNomics and structure-based bioinformatic tools. *Microbiology* 154, 3175-3187.
- Spratt, B. G., Hedge, P. J., te Heesen, S., Edelman, A. & Broome-Smith, J. K. (1986). Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* 41, 337-342.
- Storey, D. G., Ujack, E. E., Rabin, H. R. & Mitchell, I. (1998). Pseudomonas aeruginosa lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. Infect Immun 66, 2521-2528.
- Storz, G., Tartaglia, L. A. & Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248, 189-194.
- Storz, G., Opdyke, J. A. & Zhang, A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* 7, 140-144.
- Storz, G., Altuvia, S. & Wassarman, K. M. (2005). An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* 74, 199-217.

- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E. & Ohman, D. E. (1999). Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 3890-3897.
- Sukdeo, N. & Honek, J. F. (2008). Microbial glyoxalase enzymes: metalloenzymes controlling cellular levels of methylglyoxal. *Drug Metabol Drug Interact* 23, 29-50.
- 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, 1639-1644.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28, 33-36.
- Thompson, L. S., Webb, J. S., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2003). The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhlI* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **220**, 187-195.
- Thornalley, P. J. (1993). The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* 14, 287-371.
- Tian, Z. X., Mac Aogain, M., O'Connor, H. F., Fargier, E., Mooij, M. J., Adams, C., Wang, Y. P. & O'Gara, F. (2009). MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog* 47, 237-241.
- Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). Pseudomonas aeruginosa LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. Mol Microbiol 5, 2003-2010.
- Toder, D. S., Ferrell, S. J., Nezezon, J. L., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1994). lasA and lasB genes of Pseudomonas aeruginosa: analysis of transcription and gene product activity. Infection and immunity 62, 1320-1327.
- Tominaga, K., Higuchi, K., Hamasaki, N., Hamaguchi, M., Takashima, T., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Kadota, S.,

- Ishii, E., Kobayashi, K. & Arakawa, T. (2002). In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother 50, 547-552.
- Tomlin, K. L., Malott, R. J., Ramage, G., Storey, D. G., Sokol, P. A. & Ceri, H. (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71, 5208-5218.
- Toyofuku, M., Nomura, N., Kuno, E., Tashiro, Y., Nakajima, T. & Uchiyama, H. (2008). Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190, 7947-7956.
- Trumpower, B. L. (1990a). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 265, 11409-11412.
- Trumpower, B. L. (1990b). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* 54, 101-129.
- Tu, K. C. & Bassler, B. L. (2007). Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Genes Dev 21, 221-233.
- Tyrrell, R., Verschueren, K. H., Dodson, E. J., Murshudov, G. N., Addy, C. & Wilkinson, A. J. (1997). The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. Structure 5, 1017-1032.
- Ueda, A., Attila, C., Whiteley, M. & Wood, T. K. (2009). Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microbial biotechnology* 2, 62-74.
- Unemoto, T. & Hayashi, M. (1993). Na(+)-translocating NADH-quinone reductase of marine and halophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 25, 385-391.
- Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. & Nojiri, H. (2004). Transcriptional regulation of the ant operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J Bacteriol* 186, 6815-6823.
- Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W. & Whyte, M. K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168, 1861-1868.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 51, 1525-1533.

- Van Delden, C., Pesci, E. C., Pearson, J. P. & Iglewski, B. H. (1998). Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect Immun* 66, 4499-4502.
- Ventre, I., Ledgham, F., Prima, V., Lazdunski, A., Foglino, M. & Sturgis, J. N. (2003). Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* 48, 187-198.
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 171-176.
- Vial, L., Groleau, M. C., Dekimpe, V. & Deziel, E. (2007). Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol 17, 1407-1429.
- Vial, L., Lepine, F., Milot, S., Groleau, M. C., Dekimpe, V., Woods, D. E. & Deziel, E. (2008). Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. J Bacteriol 190, 5339-5352.
- Vial, L., Groleau, M. C., Lamarche, M. G., Filion, G., Castonguay-Vanier, J., Dekimpe, V., Daigle, F., Charette, S. J. & Deziel, E. (2010). Phase variation has a role in *Burkholderia ambifaria* niche adaptation. *ISME J* 4, 49-60.
- Vinckx, T., Wei, Q., Matthijs, S. & Cornelis, P. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology* 156, 678-686.
- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* 15, 22-30.
- Vogel, A., Schilling, O., Niecke, M., Bettmer, J. & Meyer-Klaucke, W. (2002). ElaC encodes a novel binuclear zinc phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277, 29078-29085.
- Voggu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. & Gotz, F. (2006). Microevolution of cytochrome bd oxidase in Staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *J Bacteriol* 188, 8079-8086.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 4372-4380.

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185, 2080-2095.

Wagner, V. E., Gillis, R. J. & Iglewski, B. H. (2004). Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 22 Suppl 1, S15-20.

Wagner, V. E., Li, L. L., Isabella, V. M. & Iglewski, B. H. (2007). Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem 387, 469-479.

Wassarman, K. M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G. & Gottesman, S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* 15, 1637-1651.

Wassarman, K. M. (2007a). 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol* 65, 1425-1431.

Wassarman, K. M. (2007b). 6S RNA: a small RNA regulator of transcription. Curr Opin Microbiol 10, 164-168.

Waters, L. S. & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. Cell 136, 615-628.

Watson, A. A., Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1996). Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 172, 163-164.

Wells, I. C. (1952). Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*; syntheses of Pyo Ib, Pyo Ic, and Pyo III. *J Biol Chem* 196, 331-340.

Wensinck, F., van Dalen, A. & Wedema, M. (1967). Iridescent material and the effect of iron on its production by *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek 33, 73-86.

Whitchurch, C. B., Beatson, S. A., Comolli, J. C., Jakobsen, T., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., West, J., Klausen, M., Waite, L. L., Kang, P. J., Tolker-Nielsen, T., Mattick, J. S. & Engel, J. N. (2005). *Pseudomonas aeruginosa fimL* regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol Microbiol* 55, 1357-1378.

White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y. M. & Rock (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 74, 791-831.

Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13904-13909.

- Whiteley, M., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 4356-4360.
- Whiteley, M. & Greenberg, E. P. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* 183, 5529-5534.
- Whitlock, G. C., Estes, D. M. & Torres, A. G. (2007). Glanders: off to the races with Burkholderia mallei. FEMS Microbiol Lett 277, 115-122.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Kohler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P. & Tummler, B. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 8101-8106.
- Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9792-9797.
- Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923-3938.
- Williams, P. & Camara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12, 182-191.
- Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P., Bycroft, B. W. & et al. (1995). Multiple Nacyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9427-9431.
- Winsor, G. L., Lo, R., Sui, S. J. H., Ung, K. S. E., Huang, S. S., Cheng, D., Ching, W. K. H., Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Research* 33, D338-D343.
- Workentine, M. L., Chang, L., Ceri, H. & Turner, R. J. (2009). The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiol Lett* **292**, 50-56.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C. & Doring, G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109, 317-325.

- Wu, H., Song, Z., Givskov, M., Doring, G., Worlitzsch, D., Mathee, K., Rygaard, J. & Hoiby, N. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *lasI* and *rhlI* quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology* 147, 1105-1113.
- Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M. H., Milot, S., Tampakaki, A. P., Stachel, S. E. & Rahme, L. G. (2006a). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* 62, 1689-1699.
- Xiao, G., He, J. & Rahme, L. G. (2006b). Mutation analysis of the *Pseudomonas* aeruginosa mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. Microbiology 152, 1679-1686.
- Xu, H., Lin, W., Xia, H., Xu, S., Li, Y., Yao, H., Bai, F., Zhang, X., Bai, Y., Saris, P. & Qiao, M. (2005). Influence of ptsP gene on pyocyanin production in Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Lett 253, 103-109.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36, 1251-1275.
- Yamanaka, T. (1976). Change in the ratio of cytochrome oxidase activity to nitrite reductase activity of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase with the kind of C-type cytochrome used as an electron donor. *J Biochem* 79, 435-440.
- 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, 103-119.
- Yohannes, E., Thurber, A. E., Wilks, J. C., Tate, D. P. & Slonczewski, J. L. (2005). Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol* 5, 59.
- Yoon, S. S., Karabulut, A. C., Lipscomb, J. D., Hennigan, R. F., Lymar, S. V., Groce, S. L., Herr, A. B., Howell, M. L., Kiley, P. J., Schurr, M. J., Gaston, B., Choi, K. H., Schweizer, H. P. & Hassett, D. J. (2007). Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J* 26, 3662-3672.
- Yoshikawa, K., Nakayama, Y., Hayashi, M., Unemoto, T. & Mochida, K. (1999). Korormicin, an antibiotic specific for gram-negative marine bacteria, strongly inhibits the respiratory chain-linked Na+-translocating NADH: quinone reductase from the marine Vibrio alginolyticus. J Antibiot (Tokyo) 52, 182-185.

- Yu, S., Jensen, V., Seeliger, J., Feldmann, I., Weber, S., Schleicher, E., Haussler, S. & Blankenfeldt, W. (2009). Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) response protein. *Biochemistry* 48, 10298-10307.
- Zannoni, D. (1989). The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochim Biophys Acta* 975, 299-316.
- Zhang, A., Altuvia, S. & Storz, G. (1997). The novel oxyS RNA regulates expression of the sigma s subunit of Escherichia coli RNA polymerase. Nucleic Acids Symp Ser, 27-28.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G. & Gottesman, S. (2003). Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* 50, 1111-1124.
- Zhang, Q. M., Takemoto, T., Mito, S. & Yonei, S. (1996). Induction of repair capacity for oxidatively damaged DNA as a component of peroxide stress response in *Escherichia coli. J Radiat Res (Tokyo)* 37, 171-176.
- Zhang, Y. M., Frank, M. W., Zhu, K., Mayasundari, A. & Rock, C. O. (2008). PqsD is responsible for the synthesis of DHQ, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*.
- Zheng, P., Sun, J., Geffers, R. & Zeng, A. P. (2007). Functional characterization of the gene PA2384 in large-scale gene regulation in response to iron starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biotechnol* 132, 342-352.
- Zhu, J. & Winans, S. C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1507-1512.
- Zierdt, C. H. (1971). Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 37, 319-337.