

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

PURIFICATION ET ÉTUDE DES PROTÉINES PQSB ET PQSC DE LA VOIE DE
BIOSYNTHÈSE DES HAQ CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Par
David-Alexandre Fauvelle

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M. Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

François Shareck Ph. D.
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Daniel Dubreuil Ph. D.
Université de Montréal

Directeur de recherche

François Lépine Ph. D.
INRS-Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire d'une grande versatilité et un pathogène opportuniste. Les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont une des premières causes de mortalité chez les gens atteints de la fibrose kystique. Cette bactérie est naturellement résistante à plusieurs antibiotiques communs, ce qui rend difficile le traitement de telles infections.

L'expression de plusieurs gènes de virulence chez *P. aeruginosa* est contrôlée par des systèmes de communications intercellulaires appelés *Quorum Sensing* (QS). Un de ces systèmes est le régulon *pqs* qui est responsable de la production de 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) qui sont une famille de molécules qui inclut le *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) et le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), son précurseur. La synthèse de ces molécules de signalisation est faite par les protéines codées par l'opéron *pqsABCDE*. Les rôles de PqsA ainsi que de PqsD sont connus dans la synthèse du 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), mais le rôle de PqsD, PqsB et PqsC dans la biosynthèse des HAQ reste à découvrir.

Les travaux présentés ici ont pour but de purifier et subséquemment caractériser l'activité des protéines PqsB et PqsC. La protéine PqsB a pu être purifiée à l'aide d'une étiquette d'hexahistidine par chromatographie d'affinité et son identité a été confirmée grâce au séquençage par CL/SM-SM. La protéine PqsC n'a pu être purifiée.

D'autres expériences ont aussi été effectuées dans le but d'explorer l'origine des carbones de la queue aliphatique des HAQ. Pour ce faire, des expériences de marquage avec l'acide dodécanoïque marqué de 23 atomes de deutérium ont été effectuées. Ces expériences ont démontré un marquage des HAQ au niveau de la chaîne aliphatique. Ceci remet en question le concept généralement accepté que des acides 3-cétodécanoïques seraient des précurseurs des HAQ. D'autres expériences de marquage avec de l'acide octanoïque marqué de 19 atomes de deutérium ont confirmé que l'acide octanoïque était un précurseur du HHQ plutôt qu'un acide 3-cétodécanoïque.

Les résultats présentés ici ont mené à une nouvelle hypothèse concernant la voie de biosynthèse du HHQ qui aurait comme précurseurs l'acide anthranilique, le malonate et l'acide octanoïque. De plus, ces résultats démontrent indirectement que les protéines PqsB et PqsC sont responsables de l'ajout de la chaîne aliphatique aux précurseurs du HHQ.

REMERCIEMENTS

J'aimerais prendre cette opportunité pour remercier mon directeur de recherche, le professeur François Lépine pour l'opportunité de travailler sur ce projet et pour ses conseils précieux lors du déroulement de mes travaux. J'aimerais aussi remercier le professeur Éric Déziel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour son soutien tout au long du projet.

Il est aussi important que je remercie tous les membres des laboratoires du professeur Lépine et du professeur Déziel. Sans leur aide, je n'aurais pas été capable d'accomplir ce projet et mon séjour à l'institut Armand-Frappier n'aurait jamais été aussi plaisant. Je remercie aussi Guillaume Brault pour son aide précieuse lors de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier monoureuse Marilyn, mes parents Christiane et David ainsi que ma famille pour leur support et soutien lors du déroulement de mes études.

RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	11
1.1 <i>Quorum sensing</i>	11
1.1.1 Définition et principes	11
1.1.2 Molécules de signalisation et <i>quorum sensing</i>	12
1.1.2.1 Les homosérines lactones.....	13
1.1.2.2 Les oligopeptides auto-inducteurs.....	14
1.1.3 Avantages de la multicellularité.....	15
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.2.1 Virulence	17
1.2.2 <i>Quorum sensing</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.2.2.1 Biosynthèse des HAQ	21
2 OBJECTIFS	25
2.1 Objectif général	25
2.2 Objectifs spécifiques.....	25
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
3.1 Souches bactériennes utilisées.....	27
3.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	27
3.2 Milieux de culture et antibiotiques	28
3.2.1 Milieux de culture.....	28
3.2.2 Antibiotiques	28
3.3 Conditions de cultures	29
3.3.1 Conditions de cultures des expériences de marquage	29
3.4 Biologie moléculaire	29

3.4.1	Amplification de l'ADN par <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	30
3.4.2	Ligation.....	31
3.4.3	Digestion.....	32
3.4.4	Transformation bactérienne	32
3.4.5	Plasmides utilisés.....	33
3.4.6	Extraction plasmidique	35
3.5	Protéomique	36
3.5.1	Purification par chromatographie d'affinité avec étiquette d'hexahistidine	36
3.5.1.1	Induction de l'expression des protéines avec étiquette d'hexahistidine	36
3.5.1.2	Lyse des cellules	36
3.5.1.3	Purification et dessalage des protéines.....	37
3.5.2	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique	38
3.5.3	Immunobuvardage de type Western.....	39
3.6	Analyses de CL/SM	40
4	RÉSULTATS	43
4.1	PqsD.....	43
4.1.1	Purification de la protéine PqsD-6His.	43
4.2	Expression des protéines PqsB-6His et PqsC-6His chez <i>E. coli</i> BL21(DE3) à partir des plasmides pMSR1 et pMSR2.....	48
4.2.1	Confirmation de la présence de l'étiquette d'hexahistidine par immunobuvardage de type Western.	48
4.3	Vérification de la fonctionnalité des protéines PqsB-6His et PqsC-6His par clonage des gènes <i>pqsB-6His</i> et <i>pqsC-6His</i> dans le vecteur pDN19 et transformation dans des mutants de PA14 pour complémentation.....	51
4.3.1	Amplification et ligation des gènes <i>pqsB-6His</i> et <i>pqsC-6His</i>	51
4.3.2	Digestion et ligation dans pDN19 des gènes <i>pqsB-6His</i> et <i>pqsC-6His</i>	51
4.3.3	Transformation dans les mutants de <i>P. aeruginosa</i> et vérification de la complémentation.	52
4.4	Mise au point du protocole de purification de PqsB-6His par chromatographie d'affinité. ..	53
4.5	Purification et analyse de PqsB-6His	57
4.5.1	La non reproductibilité des expériences avec PqsB-6His.....	60

4.5.2	PqsB-6His devient insoluble.....	61
4.6	L'acide dodécanoïque deutéré	65
4.6.1	L'effet de l'acide dodécanoïque sur le QS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
4.6.2	L'acide dodécanoïque deutéré	68
4.6.3	L'acide octanoïque deutéré	76
5	DISCUSSION.....	79
5.1	Purification de la protéine PqsD-6His	79
5.2	Protéine PqsC-6His.....	79
5.2.1	Localisation de la protéine.....	79
5.2.2	Non-fonctionnalité de la protéine.....	80
5.3	Protéine PqsB-6His	81
5.3.1	PqsB-6His devient insoluble.....	81
5.4	Acide dodécanoïque	81
5.5	Acide octanoïque deutéré	85
	APPENDICE A.....	93
	BIBLIOGRAPHIE	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Système de QS de type LuxR-LuxI.....	13
Figure 1.2 Structure des oligopeptides auto-inducteurs de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figure 1.3 Schéma global du QS chez <i>P. aeruginosa</i> ainsi que la structure des molécules de signalisation connues.....	21
Figure 1.4 Voie de biosynthèse du DHQ par les protéines PqsA et PqsD	22
Figure 3.1 Schéma représentatif des températures et temps utilisés lors des réactions de polymérase en chaîne.	30
Figure 3.2 Schéma du vecteur pET303/CT-His.....	34
Figure 3.3 Schéma du vecteur pGEM-T Easy.....	34
Figure 3.4 Schéma du vecteur pDN19	35
Figure 3.5 Représentation schématique de l'interaction entre les atomes de nickel fixés à la résine et les résidus histidine d'une protéine à purifier.....	38
Figure 4.1 Résultat de séquençage après digestion tryptique de la bande obtenue sur gel de polyacrylamide correspondant à la protéine PqsD-6His.....	44
Figure 4.2 Peptides tryptiques observés lors du séquençage de PqsD-6His	45
Figure 4.3 Gel de polyacrylamide issu d'une purification de la protéine PqsD-6His coloré au Bleu de Coomassie.....	46
Figure 4.4 Chromatogramme du DHQ produit par la protéine PqsD-6His <i>in vitro</i> ainsi que celui du standard interne (DHQd4) utilisé.....	47
Figure 4.5 Spectre du 2AA observé lors de la synthèse <i>in vitro</i> du DHQ par la protéine PqsD-6His.....	48
Figure 4.6 Schéma du vecteur pMSR1 obtenu de Mélissa Starkey	49
Figure 4.7 Expression des protéines PqsB-6His et PqsC-6His chez <i>E.coli</i> BL21(DE3).	50
Figure 4.9 Complémentation du mutant <i>pqsB</i> par pDAF3	53
Figure 4.10 Résultats de l'immunobuvardage de type Western pour déterminer les conditions optimales d'induction pour l'expression de PqsB-6His et PqsC-6His.....	55
Figure 4.11 Gel de polyacrylamide coloré au Bleu de Coomassie montrant la protéine PqsB-6His élue lors de purification par chromatographie d'affinité.	57
Figure 4.12 Résultat de séquençage après digestion tryptique de la bande obtenue sur gel de polyacrylamide correspondant à la protéine PqsB-6His	58
Figure 4.13 Peptides tryptiques observés lors du séquençage de PqsB-6His.....	59
Figure 4.14 Résultat de l'analyse par SM de la protéine PqsB-6His complète.	60

Figure 4.15 PqsB-6His insoluble après induction à plusieurs concentrations d'IPTG.....	63
Figure 4.16 Séquence de PqsB-6His.....	64
Figure 4.17 Cinétique de la production des AHL par <i>P. aeruginosa</i> PA14 en présence ou non de 1 mM d'acide dodécanoïque.....	67
Figure 4.18 Cinétique de la production de HAQ par <i>P. aeruginosa</i> PA14 en présence ou non de 1 mM d'acide dodécanoïque.....	68
Figure 4.19 Spectres des HAQ en C ₇ marqués et non marqués produits par <i>P. aeruginosa</i> PA14 en présence de 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré et 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré.....	70
Figure 4.20 Spectres des HNQ et du HQNO en C ₉ marqués et non marqués produits par <i>P. aeruginosa</i> PA14 en présence de 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré et 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré	72
Figure 4.21 Résultats de la première expérience de marquage en 2 étapes.....	74
Figure 4.22 Résultats de la deuxième expérience de marquage en 2 étapes.....	75
Figure 4.23 Spectres des HAQ marqués et non marqués produits par <i>P. aeruginosa</i> PA14 en présence de 0.5 mM d'acide octanoïque + 0.5 mM d'acide octanoïque deutéré	77
Figure 5.1 Structure de l'acide dodécanoïque et de l'acide lyngbyoïque.....	82
Figure 5.2 Schéma de la synthèse du HHQ correspondant à l'hypothèse du 3-cétoacide comme précurseur des HAQ.....	88
Figure 5.3 Schéma de la synthèse du HHQ correspondant à l'hypothèse des acides gras comme précurseurs des HAQ.....	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes <i>pqsB-6His</i> et <i>pqsC-6His</i>	31
Tableau 3.2 Exemple de gradient de solvant pour la séparation chromatographique des HAQs	41
Tableau 4.1 Retard de croissance causé par l'ajout d'acide dodécanoïque deutéré à des cultures de <i>P. aeruginosa</i>	69
Tableau 4.2 L'effet de différentes concentrations d'acide dodécanoïque et d'acide dodécanoïque deutéré sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i> PA14.	71
Tableau 4.3 L'effet de différentes concentrations d'acide octanoïque et d'acide octanoïque deutéré sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i> PA14.	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

QS: *Quorum sensing*

HSL: Homosérine lactone

HAQ: 4-hydroxy-2-alkylquinoline

HHQ: 4-hydroxy-2-heptylquinoline

HQNO: 4-hydroxy-2-heptylquinoline-*N*-oxyde

HNQ: 4-hydroxy-2-nonylquinoline

PQS: *Pseudomonas quinolone signal* (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline)

CL/SM : Appareil de chromatographie liquide relié à un spectromètre de masse

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ADN: Acide désoxyribonucléique

PCR: "Polymerase chain reaction" Réaction en chaîne par polymérase

SDS-PAGE: "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique

PVDF: polyfluorure de vinylidène

DMSO: diméthyl sulfoxyde

LETTERS TO THE EDITOR

Dr. J. H. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

Dr. J. H. H. H.

INTRODUCTION

Le terme *quorum sensing* est le nom donné à des systèmes de communications complexes retrouvés chez plusieurs microorganismes qui permettent à des populations de coordonner l'expression de certains gènes pour en optimiser l'effet. Dans bien des cas, les gènes codant pour les facteurs de virulence des bactéries sont sous le contrôle de tels systèmes. C'est le cas de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif ubiquitaire. Cette bactérie est un pathogène opportuniste qui est naturellement résistant à plusieurs antibiotiques communs. C'est la première cause de mortalité chez les patients souffrants de fibrose kystique.

Une alternative au traitement d'infections par les antibiotiques serait l'inhibition de la virulence contrôlée par le *quorum sensing* et ce, par l'inhibition de la biosynthèse des molécules de signalisation. Pour bloquer la biosynthèse de ces molécules chez *P. aeruginosa*, il est cependant essentiel de bien comprendre le rôle des différentes enzymes et intermédiaires impliqués. Il existe trois systèmes de *quorum sensing* chez *P. aeruginosa*. Les travaux présentés ici portent sur le système *pqs* qui est basé sur la synthèse et la détection de molécules de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ). Les molécules de signalisation de ce système sont synthétisées par quatre protéines : PqsA, PqsB, PqsC, et PqsD, mais le rôle des protéines PqsB, PqsC et PqsD reste encore inconnu. Le but de ces travaux est d'élucider la fonction de ces deux premières protéines dans la synthèse des HAQ.

En ce qui a trait aux HAQ, la plupart des auteurs considèrent que ces molécules de signalisation sont synthétisées à partir de l'acide anthranilique qui est condensé avec un 3-cétoacide. Notre hypothèse initiale était que les protéines PqsB et PqsC sont responsables de l'étape finale de cette synthèse qui implique l'ajout d'un 3-cétoacide à un précurseur dérivé de l'acide anthranilique, car il était généralement accepté que la chaîne aliphatique des HAQ serait dérivée d'un 3-cétoacide.

The first of these is the fact that the
 year 1870 was a year of general
 depression in the United States.
 The second is the fact that the
 year 1871 was a year of general
 depression in the United States.
 The third is the fact that the
 year 1872 was a year of general
 depression in the United States.
 The fourth is the fact that the
 year 1873 was a year of general
 depression in the United States.
 The fifth is the fact that the
 year 1874 was a year of general
 depression in the United States.
 The sixth is the fact that the
 year 1875 was a year of general
 depression in the United States.
 The seventh is the fact that the
 year 1876 was a year of general
 depression in the United States.
 The eighth is the fact that the
 year 1877 was a year of general
 depression in the United States.
 The ninth is the fact that the
 year 1878 was a year of general
 depression in the United States.
 The tenth is the fact that the
 year 1879 was a year of general
 depression in the United States.

1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Quorum sensing

Pendant longtemps, il était accepté que les bactéries retrouvées dans l'environnement vivaient indépendamment les unes des autres. Certaines découvertes des dernières décennies ont mis en doute cette hypothèse. En effet, il est de plus en plus apparent que les bactéries retrouvées dans l'environnement existent en communauté et que celles-ci communiquent entre elles. La plupart des populations bactériennes retrouvées dans l'environnement vivent attachées à des surfaces. Ces organismes forment des structures ordonnées qui facilitent la protection des bactéries ainsi que la distribution des nutriments et l'évacuation des déchets. Ces structures communautaires sont appelées biofilms. La formation de ces communautés bactériennes est rendue possible grâce à la communication bactérienne appelée *quorum sensing* ou QS. Ce système est basé sur la production, la diffusion et la détection de petites molécules qui servent de signal.

1.1.1 Définition et principes

Le principe de multicellularité bactérienne n'est plus contesté. Il a été démontré que ce comportement peut être retrouvé dans plus d'une centaine d'espèces bactériennes, un nombre qui grandit constamment. Une définition populaire de la multicellularité bactérienne a été proposée par Shapiro en 1998 (Shapiro, 1998). Selon cet auteur, les cellules bactériennes auraient la capacité de communiquer et "prendre des décisions collectives" en ce qui concerne leur comportement. Ceci donnerait la capacité aux populations bactériennes de coordonner leur croissance, leur mouvement et leurs activités biochimiques. De nombreux exemples de communication et de coordination ont été retrouvés chez plusieurs taxa bactériens et ne sont pas limités à quelques groupes avec une vocation de spécialisation cellulaire. Un autre concept important est que la multicellularité bactérienne apporte des avantages adaptatifs aux populations bactériennes. La division des tâches que permet la multicellularité permet aux populations de mieux proliférer et d'accéder à des sources de nutriments qui seraient normalement hors de portée des cellules individuelles.

Bien que cette définition reste large, elle englobe bien les principes qui gouvernent le phénomène répandu qui est la multicellularité bactérienne et met bien en évidence l'importance de la communication intercellulaire. La multicellularité bactérienne repose indéniablement sur les systèmes de communication intercellulaires comme le *quorum sensing* (QS).

1.1.2 Molécules de signalisation et *quorum sensing*

Le terme *quorum sensing* a été proposé en 1994 dans une revue de littérature traitant de la communication bactérienne dépendante de la densité cellulaire entres autres chez *Vibrio fischeri* (Fuqua *et al.*, 1994). Le QS est basé sur la synthèse de petites molécules diffusibles qui s'accumulent ensuite dans le milieu. Puisque toutes les bactéries d'une même espèce produisent cette molécule, celle-ci devient une indicatrice de la densité de ces cellules présentes. Lorsque la concentration de molécule de signalisation atteint un certain seuil, on peut observer une activation du système de QS, ce qui mène à une augmentation de l'expression des gènes sous le contrôle de ce système. Certains gènes seront activés tandis que d'autres seront réprimés, les résultats étant que la population bactérienne peut coordonner et contrôler l'expression de gènes bien précis pour accomplir des tâches que les bactéries individuelles ne pourraient pas. Les gènes activés incluent les gènes nécessaires à la synthèse de la molécule de signalisation produisant ainsi une boucle de rétroaction positive. Les molécules utilisées comme signal dans ces systèmes complexes partagent certaines caractéristiques, peu importe le système. En 2002 Winzer et coll. (Winzer *et al.*, 2002) ont proposé certains critères définissant les molécules de signalisation.

1. La molécule doit être produite à un stade spécifique de croissance, sous certaines conditions physiologiques ou environnementales.
2. La molécule doit s'accumuler dans le milieu extracellulaire et être reconnue par un récepteur spécifique.
3. L'accumulation de la molécule doit générer une réponse concertée seulement une fois une concentration seuil critique atteinte.
4. La réponse cellulaire une fois la concentration seuil atteinte doit dépasser les simples changements physiologiques requis pour métaboliser ou détoxifier la molécule.

1.1.2.1 Les homosérines lactones

Les homosérine lactones, aussi appelée acylhomosérine lactones (AHL), sont des molécules de signalisation utilisées par des bactéries à Gram négatif, plus spécifiquement les bactéries des familles des α , β et γ -protéobactéries (Gray & Garey, 2001). Ces molécules sont suffisamment petites pour diffuser à travers les membranes des bactéries et s'accumuler dans le milieu extracellulaire jusqu'à l'atteinte de la concentration seuil (Kaplan & Greenberg, 1985). Elles sont synthétisées par des homologues de la protéine LuxI retrouvée chez *Vibrio fischeri* et sont détectées par des homologues de la protéine LuxR. Une fois l'AHL liée à LuxR, le complexe AHL-LuxR vient activer l'expression des gènes sous le contrôle du système QS, dont les gènes codant pour LuxI et LuxR (Engebrecht & Silverman, 1984) (voir Figure 1.1).

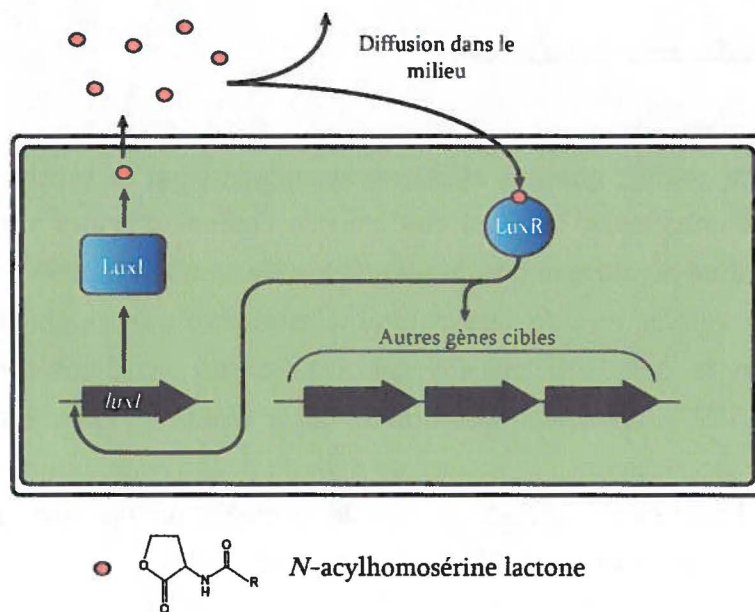


Figure 1.1 Système de QS de type LuxR-LuxI

Inspiré de (C. Fuqua, Parsek, & Greenberg, 2001)

Un exemple de systèmes de QS basé sur les AHL est la biosynthèse de la luciférase par la bactérie *V. fischeri*. C'est chez cette bactérie que le système de QS basée sur les AHL a été découvert. Cette bactérie est retrouvée chez plusieurs espèces aquatiques d'eucaryotes supérieurs où elle vie en symbiose avec sont hôte. Par exemple : *V. fischeri* peut être retrouvé dans des organes spécialisés chez une espèce du calmar *Euprymna scolopes* qui l'utilise à des

fins de production de bioluminescence (McFall-Ngai & Ruby, 1991). La luciférase est responsable de la production de lumière par cette bactérie, mais les gènes codant pour cette protéine ne sont pas exprimés lorsque la densité de population est faible, puisque la lumière ne serait pas visible dans ce cas. L'expression de ces gènes est donc sous le contrôle du QS, permettant l'expression de ces derniers lorsque la densité bactérienne atteint un niveau suffisant pour créer de la lumière visible. Ceci permet donc de ne pas gaspiller de l'énergie à la synthèse de luciférase lorsque cela serait inutile (Ulitzur & Hastings, 1979).

La Figure 1.1, présente la structure des HSL qui sont composées d'un noyau homosérine lactone lié par un lien amide à une chaîne acyle (Eberhard *et al.*, 1981). La chaîne acyle peut être saturée ou insaturée et le carbone 3 peut être substitué ou non par une cétone ou un hydroxyle.

1.1.2.2 Les oligopeptides auto-inducteurs

Les bactéries à Gram positif, quant à elles, communiquent par la synthèse et la diffusion d'oligopeptides auto-inducteurs. Ce sont des courtes chaînes d'acides aminés issues de la maturation d'une chaîne peptidique plus grande (Kleerebezem *et al.*, 1997). Ces peptides sont exportés hors de la cellule lors de la synthèse, c'est-à-dire que la chaîne peptidique est transportée hors de la cellule à mesure que celle-ci est synthétisée par le ribosome (Kleerebezem *et al.*, 1997). La molécule complète, qui se trouve à l'extérieur de la cellule, est ensuite détectée par des senseurs à la surface de celle-ci et active une cascade qui se termine par l'activation de l'expression des gènes sous le contrôle du QS, incluant les gènes de synthèse des peptides auto inducteurs (Kleerebezem *et al.*, 1997).

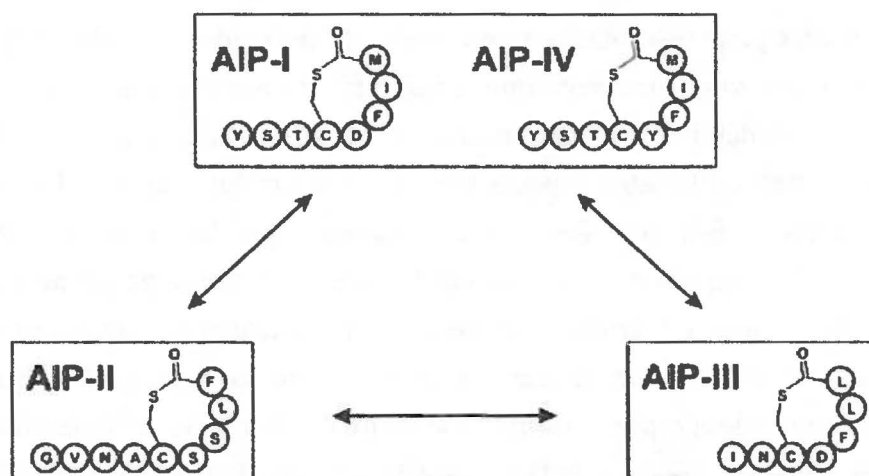


Figure 1.2 Structure des oligopeptides auto-inducteurs de la bactérie *Staphylococcus aureus*. Source : (Malone *et al.*, 2007)

Les oligopeptides auto-inducteurs produits par les bactéries à Gram positif possèdent une séquence et une structure qui est propre à chaque espèce. Ces caractéristiques sont essentielles à la détection du signal (Kleerebezem *et al.*, 1997).

1.1.3 Avantages de la multicellularité

La communication et la coopération sous la forme de QS apportent plusieurs avantages aux bactéries dans l'environnement. Ces systèmes permettent l'adoption de comportements qui seraient impossible pour une population de bactéries individuelles. En effet, plusieurs comportements bactériens sont contrôlés par le QS, dont la bioluminescence. La sporulation et la production d'antibiotiques sont aussi parfois contrôlées par le QS (Duerkop *et al.*, 2009; Grossman, 1995). Le QS est responsable de la formation des structures complexes que forment les bactéries du genre *Myxobacterium*. Ces structures aident à la survie et la dissémination (Spormann 1999; Kaiser 2008). La communication intercellulaire permet aussi à d'autres populations bactériennes de s'organiser et de se protéger dans des communautés appelées biofilms. Ce sont des structures complexes dotées d'une organisation précise et formées par des microorganismes à partir d'une matrice d'exopolymère attachée à une surface. Ces structures offrent une protection substantielle aux microorganismes qui y habitent (Costerton, 2007). Il a été démontré que des bactéries qui vivent sous forme de biofilm résistent à des concentrations d'antibiotiques grandement supérieures aux

concentrations létales pour des bactéries en cultures (Drenkard & Ausubel 2002; Kouidhi *et al.* 2011). Les biofilms sont aussi reconnus pour offrir une protection aux bactéries qui y habitent contre des prédateurs comme certains protozoaires (Matz *et al.* 2004; Weitere *et al.* 2005; Queck *et al.* 2006). Plusieurs espèces forment des biofilms qui, une fois matures, sont composés de microcolonies séparées par des canaux qui facilitent la distribution de nutriments à toute la population et permettent l'évacuation rapide de déchets métaboliques (Costerton, 2007). Ces structures peuvent être retrouvées dans une multitude d'environnements : attachées aux racines de plantes dans la rhizosphère, dans le tractus intestinal d'une multitude d'espèces animales ainsi que fixées à des surfaces inertes dans des cours d'eau naturels ou encore dans de la tuyauterie industrielle (Costerton, 2007).

La communication intercellulaire rend aussi possible la division des tâches, un phénomène qui était attribué aux organismes multicellulaires. Cette division des tâches permet d'accomplir certaines actions qui seraient impossibles pour une population de bactéries individuelles. Par exemple, la division des tâches est nécessaire pour la motilité de type *swarming* observée chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp. et *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Kearns & Losick, 2003; Kim & Surette, 2005). C'est un déplacement organisé d'une partie d'une population bactérienne sur une surface à l'aide de flagelles.

Le QS est souvent associé à la virulence des bactéries. L'expression de plusieurs facteurs de virulence chez des espèces infectieuses est sous le contrôle de systèmes de QS. Ceci permet à la bactérie de coloniser l'hôte sans exprimer de facteurs de virulence, rendant la détection par le système immunitaire plus difficile. Une fois la population établie dans l'hôte, la concentration de molécules de signalisation atteint la concentration seuil et active le QS qui, à son tour, active l'expression des facteurs de virulences permettant ainsi de submerger les défenses de l'hôte (Deep, Chaudhary, & Gupta, 2011).

Il a été démontré que si les systèmes de QS de *P. aeruginosa* sont inhibés, la virulence de ces bactéries est grandement diminuée, mais la viabilité cellulaire n'est pas affectée (Lesic *et al.* 2007). Dans un contexte où la résistance aux antibiotiques est un phénomène qui devient de plus en plus commun, il devient intéressant de trouver des méthodes alternatives de traitement d'infections. En effet, un nombre croissant d'espèces voient apparaître des souches qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques communs. Ce problème peut être attribué en partie à une mauvaise utilisation d'antibiotiques. La prescription d'antibiotiques alors qu'ils ne sont pas nécessaires, applique une pression de sélection sur les populations bactériennes, ce qui favorise la sélection de mutants résistants à l'antibiotique. Une nouvelle approche qui

est envisagée serait d'utiliser des molécules visant à inhiber spécifiquement le QS des bactéries infectieuses (Hentzer & Givskov, 2003; Sintim *et al.* 2010). Pour plusieurs pathogènes, incluant *P. aeruginosa* dont les gènes de virulence sont sous le contrôle du QS, cette approche permettrait d'inhiber la virulence sans causer la mort des bactéries. Puisque cela n'affecterait pas la viabilité cellulaire, l'apparition de résistance à ces molécules serait moins favorisée. Par contre, pour que cette approche soit viable, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des systèmes de QS chez les bactéries infectieuses.

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif qui fait partie de la famille des γ -proteobactérie. C'est une bactérie avec un métabolisme versatile qui lui permet de coloniser une grande variété d'environnements. *P. aeruginosa* est classifié comme une bactérie aérobie, mais elle a la capacité de croître dans des conditions avec peu ou pas d'oxygène. Elle est motile et possède des flagelles en organisation unipolaire (Bergey & Breed, 1957).

1.2.1 Virulence

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste chez l'humain et chez les plantes. En effet il est reconnu que cette bactérie peut causer des infections graves chez des patients dont le système immunitaire est affaibli ainsi que chez les grands brûlés. Des biofilms de *P. aeruginosa* ont aussi été retrouvés sur des lentilles cornéennes (Green *et al.*, 2008) . De plus, les infections à *P. aeruginosa* sont la première cause de mortalité chez les patients atteints de la fibrose kystique (Singh *et al.*, 2000). La fibrose kystique cause une accumulation de mucus dans les voies respiratoires et les poumons des patients atteints, formant des conditions idéales pour le développement de biofilms par cette espèce (Bjarnsholt *et al.*, 2009, 2010). Une fois le biofilm formé dans les poumons, il devient très difficile de l'éliminer et l'infection peut progresser. De plus, cette bactérie est naturellement résistante à plusieurs antibiotiques notamment grâce à la perméabilité restreinte de la membrane externe (Trias *et al.*, 1989) en combinaison avec la présence d'une multitude de gènes chromosomiques codant pour des pompes à efflux (Poole *et al.*, 1993). Cette résistance rend le traitement de ces infections plus difficile. La bactérie peut causer des infections dites aiguës ou des infections chroniques. Les infections

aiguës sont caractérisées par une progression rapide et des symptômes graves. Lors de ce type d'infection, la virulence nécessite l'expression du régulateur MvfR. (Kesarwani *et al.*, 2011). Les infections chroniques quant à elles, progressent plus lentement, mais sont souvent récurrentes. Les mécanismes qui contrôlent ces phénomènes sont encore mal connus. Les infections chroniques augmentent la mortalité des patients atteints de fibrose kystique et sont causées par la formation de biofilms (Singh *et al.* 2000; Al-Aloul *et al.* 2004). Ces structures offrent une protection additionnelle aux bactéries contre les antibiotiques. Des biofilms ont aussi été observés dans les plaies des grands brûlés (Schaber *et al.*, 2007).

Des études ont été effectuées sur les liens qui existeraient entre la formation de biofilm et le QS chez *P. aeruginosa*. Il semblerait que le QS ne soit pas nécessaire à la formation des biofilms dans certaines conditions puisque des mutants déficients pour les gènes de QS sont capables de former des biofilms dans un contexte d'infection aiguë (Schaber *et al.*, 2007). Par contre, la communication intercellulaire semble jouer un rôle dans la maturation des biofilms, puisque les biofilms d'une bactérie mutante pour le gène *lasI* ne présentent pas les structures complexes en forme de champignons normalement observées chez la souche sauvage (Davies *et al.* 1998). Il semblerait aussi que le QS soit impliqué dans la dispersion de biofilms établis (Dong *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que la virulence de cette bactérie est dépendante du QS (Rahme *et al.* 1995; Pearson *et al.* 2000; Cao *et al.* 2001). Les mutants dont les systèmes de QS ont été inactivés sont moins virulents et causent des taux de mortalité similaires à ceux de mutants chez qui les facteurs de virulence sont directement désactivés, dans un test de toxicité aiguë chez la souris (Xiao *et al.* 2006).

Les facteurs de virulence sous le contrôle des systèmes de QS chez *P. aeruginosa* incluent la synthèse des élastases LasA (Toder *et al.*, 1991) et LasB (Gambello & Iglewski 1991; Pearson *et al.* 1997) , l'exotoxine A (Gambello *et al.*, 1993) et des sidérophores pyocyanine (Gallagher *et al.* 2002) et pyoverdine (Diggle *et al.*, 2007) ainsi que la production de rhamnolipides (Pearson *et al.*, 1997), des agents mouillants qui servent à la motilité de type swarming (Tremblay *et al.*, 2007) ainsi que la protection contre certains éléments du système immunitaire lors d'infections. Il a notamment été rapporté que les rhamnolipides synthétisés par *P. aeruginosa* causaient la mort de granulocytes chez l'humain (Jensen *et al.* 2007).

1.2.2 Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Il existe trois systèmes de QS chez *P. aeruginosa* : les systèmes *rhl* (Brint & Ohman, 1995) et *las* (Gambello & Iglewski 1991) qui sont des analogues du système *luxR* de *V. fischeri* et le système *pqs*, un système basé sur la synthèse et la détection du *Pseudomonas* Quinolone Signal ou PQS (Pesci *et al.* 1999). Les systèmes de QS de *P. aeruginosa* sont organisés en hiérarchie : le système *las* est responsable de l'activation du système *rhl* (Latifi *et al.* 1996; Pesci *et al.* 1997). Il est aussi rapporté que l'expression du système *pqs* est activée par le système *las*, mais réprimé par le système *rhl* (McGrath *et al.*, 2004). De plus, le système *pqs* active l'expression du système *rhl* (McKnight *et al.* 2000). Par contre, des données récentes du laboratoire du professeur Déziel démontrent que cette hiérarchie n'est pas stricte, mais que le contrôle des systèmes de QS est maintenu par des interactions complexes. Certains gènes régulés par le système *rhl* sont aussi contrôlés par le système *pqs*. De plus, certains gènes contrôlés par les systèmes *rhl* et *pqs* sont quand même exprimés chez un mutant *lasR*, leur expression n'était pas inhibée, mais seulement retardée, ce qui indique que le contrôle d'un système sur un autre n'est donc pas absolu (Dekimpe & Déziel, 2009) (voir Figure 1.3). En 2003 un groupe du Royaume-Uni (Schuster *et al.*, 2003) a trouvé que 315 gènes étaient régulés à la hausse par les systèmes conjugués de QS *rhl* et *las*, ce qui représente environ 6 % du génome de *P. aeruginosa*. De plus, 38 gènes étaient régulés à la baisse par les mêmes systèmes.

rhlR : Ce système est composé des protéines RhlR et RhlI (Brint & Ohman, 1995). La protéine RhlI, un homologue de LuxI, est responsable de la synthèse du *N*-butyroyl homosérine lactone (C₄-HSL) (Pearson *et al.*, 1995), une molécule de signalisation appartenant à la famille des HSL. Cette molécule se lie à la protéine RhlR, un homologue de LuxR. Le complexe RhlR/C₄-HSL agit ensuite comme activateur transcriptionnel pour les gènes sous le contrôle de ce système. La transcription des gènes *rhlI* et *rhlR* est aussi activée, créant ainsi une boucle de rétroaction positive.

lasR : Ce système est composé des protéines LasR (Gambello & Iglewski 1991) et LasI (Pearson *et al.*, 1994). La protéine LasI, un homologue de LuxI, synthétise le *N*-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Pearson *et al.*, 1994). Cette molécule vient lier LasR, qui est un homologue de LuxR, et le complexe LasR/3-oxo-C₁₂ HSL vient activer la transcription des gènes sous le contrôle de ce système incluant *lasI* et *lasR* créant ainsi une boucle de rétroaction positive comme pour le système *rhlR*.

pqs: Ce système est composé des protéines codées par le gène *mvfR* (Cao *et al.*, 2001) et ceux de l'opéron *pqsABCDE* (Déziel *et al.* 2004). Le système *pqs* possède deux molécules de signalisation, soit le PQS et son précurseur, le HHQ (Déziel *et al.* 2004; Xiao *et al.* 2006). Ces deux molécules sont synthétisées par plusieurs protéines.

Il a été démontré que seulement les protéines PqsA PqsB PqsC et PqsD sont nécessaires à la biosynthèse du HHQ, PqsE ne participant pas à la synthèse de cette molécule (Gallagher *et al.* 2002). Le rôle de la protéine PqsE n'est pas encore bien compris. Par analyse de sa séquence et comparaison avec des bases de données, PqsE présenterait des homologies avec la superfamille des métallo- β -lactamases (Yu *et al.*, 2009). Ceci ne permet pas de déterminer sa fonction, mais des études avec des mutants *pqsE*⁻ montrent que l'absence de ce gène n'empêche pas la synthèse de PQS (Gallagher *et al.* 2002; Déziel *et al.* 2004). Par contre, *pqsE* est requis pour la synthèse de plusieurs facteurs de virulence, dont la pyocyanine, les rhamnolipides et les élastases (Gallagher *et al.* 2002; Diggle *et al.* 2003). Il est aussi apparent que PqsE est nécessaire à la régulation du système *pqs* (Déziel *et al.* 2005), et serait impliqué dans la régulation du système *rhl* (Farrow *et al.*, 2008).

Une fois le HHQ synthétisé par les protéines PqsA, PqsB, PqsC et PqsD, la molécule est ensuite transformée en PQS par la protéine PqsH (Déziel *et al.* 2004), une monooxygénase dépendante du FAD, qui ne fait pas partie de l'opéron, mais qui est sous le contrôle de *lasR* (Gallagher *et al.* 2002). Ces molécules font partie de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ), cette famille a été découverte dans les années 50 en raison de leurs propriétés antibiotiques (Hays *et al.* 1945; Wells 1951; Takeda *et al.* 1959). Jusqu'à maintenant, 56 molécules faisant partie de la famille des HAQ ont été détectées chez *P. aeruginosa* (Lépine *et al.* 2004a). Ce n'est que longtemps après leur découverte que le rôle de certaines de ces molécules en tant que molécules de signalisation a été découvert. Le PQS se lie à la protéine MvfR, un régulateur transcriptionnel de type LysR (Xiao *et al.* 2006). Le complexe MvfR-ligand vient ensuite activer la transcription des gènes sous le contrôle de ce système, ces gènes incluent l'opéron *pqsABCDE* ainsi que l'opéron *phnAB* (Cao *et al.*, 2001) qui est responsable de la synthèse de l'acide anthranilique, précurseur du HHQ (Déziel *et al.* 2004). Comme le PQS, le HHQ se lie à MvfR et active la transcription des gènes sous son contrôle, mais l'affinité de MvfR pour le HHQ est plus faible de deux ordres de grandeur (Xiao *et al.* 2006) que pour le PQS. La présence de PQS est cependant nécessaire à l'expression de plusieurs facteurs de virulence. Du HHQ et du PQS ont été retrouvés chez des patients infectés par *P. aeruginosa* que ce soit au niveau de blessures ou dans les poumons de patients atteints de la fibrose kystique (Collier *et al.* 2002; Guina *et al.* 2003; Que *et al.* 2011).

Il a été démontré que la présence de MvfR est nécessaire pour l'expression de plusieurs facteurs de virulence, dont la pyocyanine (Cao *et al.* 2001), le cyanure d'hydrogène (HCN) (Gallagher & Manoil 2001) et l'élastase LasB (Pesci *et al.* 1999)

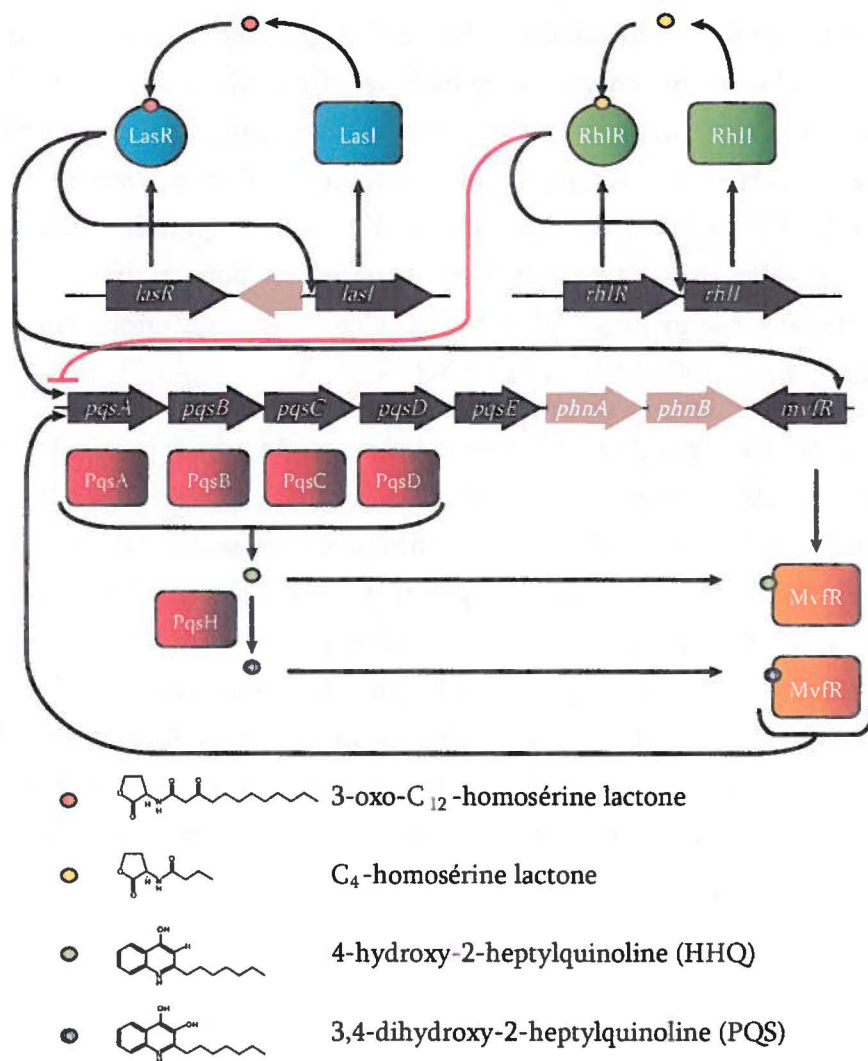


Figure 1.3 Schéma global du QS chez *P. aeruginosa* ainsi que la structure des molécules de signalisation connues. Inspiré de (Dekimpe & Déziel 2009)

1.2.2.1 Biosynthèse des HAQ

Les HAQ sont des molécules hétérocycliques aromatiques composées d'un noyau quinoline avec une chaîne alkyle en position 2. Ce sont des molécules hydrophobes et peu solubles dans des conditions aqueuses, mais solubles dans plusieurs solvants organiques (Hays *et al.* 1945;

Wells 1951). Le PQS est diffusé entre les cellules par des microvésicules de façon à pouvoir agir comme une molécule de signalisation malgré sa solubilité restreinte (Mashburn & Whiteley 2005)

La voie de biosynthèse de ces molécules a été étudiée par plusieurs chercheurs depuis leur découverte, mais elle reste encore énigmatique. Cependant la biosynthèse du 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), une molécule présentant des similarités structurales avec celles des HAQ, a été rapportée et pourrait donner certaines indications sur la voie possible de biosynthèse des HAQ. Le DHQ est aussi formé d'un noyau quinoline mais possède deux groupements hydroxyles en position 2 et 4. Sa structure est donc similaire à celle du HHQ, qui possède cependant une chaîne aliphatique en C7 en position 2 plutôt qu'un groupement hydroxyle (Lépine *et al.* 2004b; Zhang *et al.* 2008).

Le DHQ est synthétisé à partir de l'acide anthranilique qui est aussi le précurseur du HHQ et du PQS (Déziel *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2008). L'acide anthranilique est synthétisé à partir de l'acide chorismique par les protéines PhnA et PhnB dont les gènes correspondants sont aussi organisés en un opéron situé en amont de l'opéron *pqsABCDE* et régulés par MvfR (Cao *et al.* 2001). Il existe aussi d'autres sources d'acide anthranilique chez *P. aeruginosa* comme la synthase composée des protéines TrpE et TrpG qui sont impliquées dans la biosynthèse du tryptophane (Farrow & Pesci 2007). Il est probable que deux molécules avec des structures semblables et qui partagent un précurseur commun soient synthétisées de manière similaire. Deux des protéines impliquées dans la biosynthèse du HHQ sont requises pour la biosynthèse DHQ. En effet, PqsA et PqsD sont les seules protéines nécessaires pour la synthèse du DHQ à partir de l'acide anthranilique et du malonyl-CoA (Lépine *et al.* 2004b; Zhang *et al.* 2008).

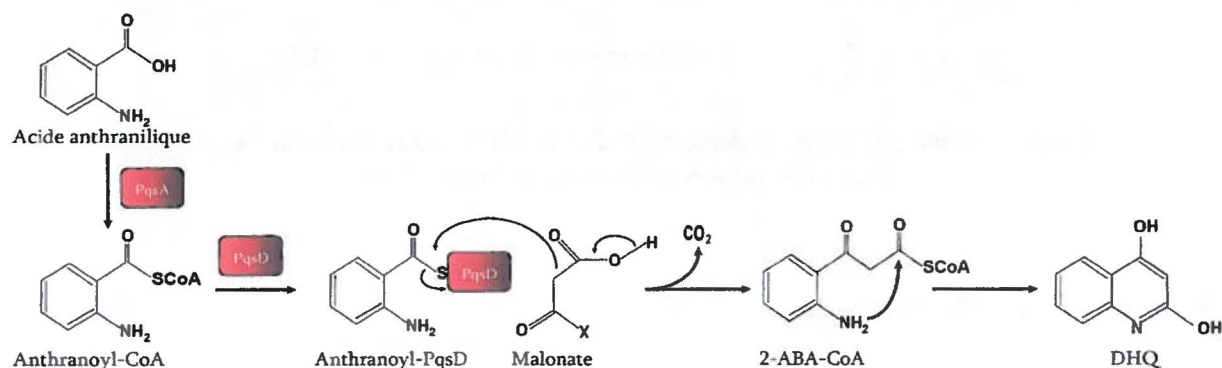


Figure 1.4 Voie de biosynthèse du DHQ par les protéines PqsA et PqsD

Adapté de (Zhang *et al.* 2008).

La protéine PqsA contient 514 acides aminés et fait partie de la famille des coenzyme A ligases (Coleman *et al.* 2008). Ces protéines ont comme rôle l'activation de la fonction carboxylique de molécules par liaison de celle-ci avec un coenzyme A. La protéine PqsA est responsable de l'activation de l'acide anthranilique avec une coenzyme A pour former l'anthranoyl-CoA (Coleman *et al.* 2008).

La protéine PqsD est une protéine de 337 acides aminés qui présente des homologies de séquence avec la famille des 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III dont la protéine modèle est FabH (Zhang *et al.* 2008; Bera *et al.* 2009). L'activité des protéines de cette famille consiste à catalyser la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA avec une molécule de malonyl-ACP (Huang *et al.* 1998). Ce sont donc des acétyltransférases. Ces protéines sont retrouvées entre autres dans le cycle de synthèse des acides gras où ils servent à allonger la chaîne d'acide gras en la condensant avec une molécule de malonyl-ACP (Cloughs *et al.* 1992). La condensation est accompagnée d'une décarboxylation et la chaîne est donc allongée de deux carbones (Cloughs *et al.* 1992). Dans la biosynthèse du DHQ catalysée par PqsD, c'est l'anthranoyl-CoA au lieu de l'acétyl-CoA qui est le substrat de l'enzyme et qui se fixe sur un résidu cystéine de PqsD. Le complexe anthranoyl-PqsD réagit avec une molécule de malonyl-CoA qui subit une décarboxylation pour former un intermédiaire qui réagira de manière spontanée pour former le DHQ (Zhang *et al.* 2008) (voir Figure 1.4).

Le rôle du DHQ dans la cellule n'est pas encore connu. Il a été démontré que le DHQ n'est pas un précurseur du HHQ (Zhang *et al.* 2008). Lorsque du DHQ a été ajouté à une culture de cellules épithéliales de souris, la molécule a causée la mort d'une partie de la culture de cellules pulmonaires murines (Zhang *et al.* 2008). Il se peut donc que le DHQ soit utile pour faciliter la croissance bactérienne dans un contexte d'infection.

Il est donc probable que les protéines PqsA et PqsD agissent de la même façon lors de la synthèse du HHQ et du DHQ. Puisque le HHQ a une chaîne aliphatique qui est absente du DHQ, les protéines PqsB et PqsC doivent intervenir dans l'ajout de la chaîne aliphatique au précurseur. PqsA activerait donc l'acide anthranilique avec un coenzyme A, qui réagirait ensuite avec PqsD pour donner anthranoyl-PqsD (Zhang *et al.* 2008). Par contre, dans la synthèse du HHQ, l'anthranoyl-PqsD devrait être condensé avec une molécule plus grande que le malonate qui formerait la chaîne aliphatique du HHQ. Il serait logique de penser que cette molécule interviendrait dans la synthèse du HHQ par l'intermédiaire des protéines PqsB ou PqsC.

PqsB est composé de 283 acides aminés tandis que PqsC est composé de 348 acides aminés. Les séquences de ces protéines ont été comparées avec la séquence de la protéine FabH de *E. coli* (Zhang *et al.* 2008). Les protéines PqsB et PqsC sont aussi prédites comme étant des homologues de FabH. FabH, tout comme PqsD, inclue un groupe de 3 résidus Cys-His-Asn qui forme son site actif. Par contre, le résidu Asn de la triade du site actif est absent pour la protéine PqsC et le groupe de 3 résidus est totalement absent de la séquence d'acides aminés de PqsB (Zhang *et al.* 2008). Comme il a été démontré que les 3 résidus sont nécessaires à l'activité enzymatique de FabH (Davies *et al.*, 2000), il est plus difficile de prédire une activité pour ces deux protéines bien que leur séquence présente certaines similarités avec FabH.

La synthèse de la queue aliphatique des HAQ a fait l'objet de quelques études. Dans les années 70, le groupe de Ritter (Ritter & Luckner 1971) a testé la théorie émise par Cornforth et James en 1956, à l'effet que la synthèse des HAQ passait par la condensation de l'acide anthranilique avec un 3-cétoacide, dans le cas du HHQ, l'acide 3-cétodécanoïque (Cornforth & James, 1956). Une expérience similaire a été rapportée par un autre groupe en 2005 (Bredenbruch *et al.*, 2005). En ajoutant de l'acétate marqué au carbone 13 ainsi que de l'acide anthranilique non marqué à une culture de *P. aeruginosa*, ce groupe a observé du HHQ marqué. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé un marquage de 9 Daltons situé sur la chaîne aliphatique et à la position 2. Ceci a été interprété comme conforme à l'hypothèse de Cornforth et James, soit l'ajout d'un acide 3-cétodécanoïque marqué avec dix carbones 13 à de l'acide anthranilique non marqué, suivi d'une décarboxylation. Tous les auteurs précédents ont donc assumé que ce 3-cétoacide était issu de la synthèse *de novo* des acides gras. Aucun d'entre eux n'a émis l'hypothèse que ce précurseur puisse provenir de la dégradation d'acide gras plus long par β -oxydation.

Une autre molécule appartenant à la famille des HAQ retrouvée dans les cultures de *P. aeruginosa* est le HQNO (Lépine *et al.* 2004a). La structure de cette molécule est apparentée à celle du HHQ, mais elle diffère par la présence d'un groupement NO en position 1. La synthèse de cette molécule nécessite la protéine PqsL (Lépine *et al.* 2004a). La fonction du HQNO n'est pas encore connue, mais il a été observé que la présence de cette molécule ralentit la croissance de *Staphylococcus aureus* et encourage chez cette espèce l'apparition de variantes formant des colonies de petite taille (*small colony variant* ou SCV). Ces deux espèces interagissent dans l'environnement puisqu'elles sont toutes deux retrouvées dans les poumons des patients atteints de la fibrose kystique (Mitchell *et al.*, 2010).

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Les travaux présentés ici avaient pour but de comprendre la voie de biosynthèse des HAQ et de purifier et caractériser l'activité des protéines PqsB et PqsC de façon à déterminer le rôle de celles-ci dans la biosynthèse des HAQ chez la bactérie *P. aeruginosa*.

2.2 Objectifs spécifiques

Afin de reproduire *in vitro* la biosynthèse des HAQ, il est nécessaire dans un premier temps d'isoler et de purifier la protéine PqsD qui est vraisemblablement impliquée dans les premières étapes de la synthèse des HAQ *in vivo*, compte tenu de son rôle démontré dans la biosynthèse du DHQ. Pour ce faire, le protocole développé par Zhang et collaborateurs sera suivi (Zhang *et al.* 2008). Un vecteur contenant PqsD avec une étiquette d'hexahistidine sera donc utilisé pour purifier cette protéine par chromatographie d'affinité. Celle-ci sera ensuite testée *in vitro* dans les mêmes conditions que Zhang et collaborateurs. Cette protéine devra donc être obtenue et démontrée active de façon à explorer subséquemment les rôles possibles des protéines PqsB et PqsC lors de tests *in vitro*.

Pour faciliter la purification de ces deux dernières protéines, des étiquettes d'hexahistidine ont été ajoutées à la séquence de celles-ci. Les protéines devront d'abord être exprimées chez des mutants de *P. aeruginosa* dans lesquels les gènes de ces protéines ne sont pas fonctionnels, de façon à vérifier si la présence de l'étiquette interfère avec l'activité de PqsB et PqsC. Les gènes incorporant les séquences des étiquettes étant insérés sur des plasmides qui ne peuvent pas se répliquer chez *P. aeruginosa*, ils devront donc d'abord être clonés sur un vecteur pouvant se répliquer dans cette espèce. Une fois le clonage et la transformation accomplis, des cultures des mutants complémentés seront analysées avec un spectromètre de masse relié à un appareil de chromatographie à phase liquide (CL-SM) pour vérifier la production de HAQ ce qui permettra de confirmer que les protéines ainsi modifiées restent fonctionnelles.

Par la suite, les protéines PqsB-6His et PqsC-6His seront surexprimées chez *E. coli* et purifiées pour ensuite être caractérisées et analysées par CL/SM pour tenter de découvrir leur fonction lors de la biosynthèse des HAQ. Par la suite, des tests *in vitro* seront effectués pour élucider et confirmer la fonction de ces protéines.

De plus, il a été rapporté récemment que l'ajout d'acide dodécanoïque à une culture de *P. aeruginosa* augmenterait l'expression de gènes contrôlés par le QS (Kwan *et al.* 2011). Ces auteurs ont observé une augmentation de la concentration de pyocyanine et de l'activité de l'élastase LasB dans les cultures suite à un ajout de 1 mM d'acide dodécanoïque. Or, ces facteurs de virulence sont sous le contrôle des systèmes de QS *las* et *rhl*. Les auteurs ont soulevé l'hypothèse que l'acide dodécanoïque pourrait être utilisé par la bactérie comme précurseur pour la synthèse de 3-oxo-C₁₂ HSL, qui est la molécule de signalisation du système *las*. Une augmentation de la concentration de ce précurseur potentiel augmenterait la synthèse du 3-oxo-C₁₂ HSL et entraînerait l'activation du système de QS correspondant ainsi que des gènes sous son contrôle.

Nous avons quant à nous émis l'hypothèse que l'acide dodécanoïque pourrait aussi être utilisé comme précurseur pour la biosynthèse des HAQ, ce qui mènerait à une augmentation de l'expression du système *pqs*. Dans un tel cas, l'acide dodécanoïque serait en un premier temps dégradé par β -oxydation en acide 3-oxodécanoïque, lequel serait un des deux précurseurs (avec l'acide anthranilique) des HAQ, selon l'hypothèse généralement acceptée à ce jour. Il faut cependant noter qu'aucun auteur n'a évoqué la possibilité que l'acide 3-oxodécanoïque puisse provenir de la β -oxydation d'acide gras à longues chaînes, la seule hypothèse trouvée dans la littérature faisant état de la synthèse *de novo* de cet intermédiaire par utilisation de l'acétate et de l'acide malonique.

Cette hypothèse sera vérifiée dans un premier temps en ajoutant de l'acide dodécanoïque à des cultures de *P. aeruginosa* PA14 à la même concentration que celle utilisée par Kwan et en quantifiant les HAQ et les HSL produits. Par la suite, une expérience similaire sera entreprise, mais où l'acide dodécanoïque ajouté sera saturé en deutérium. De cette façon, les HAQ et les HSL produits pourront être analysés pour déceler un marquage issu de l'incorporation de l'acide dodécanoïque marqué dans leur structure.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes utilisées

3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Les travaux effectués avec *P. aeruginosa* ont été faits avec la souche UCBPP-PA14 (PA14), une souche isolée d'une blessure chez un patient souffrant de brûlures (Rahme *et al.* 1995). La souche est reconnue pour sa virulence et est donc un bon modèle pour l'étude du rôle du QS lors d'infections. Cette virulence est un facteur qui marque la différence entre cette souche et une autre souche de *P. aeruginosa* couramment utilisée en laboratoire, PAO1. La virulence accrue de PA14 peut être attribuée à deux groupes de gènes liés à la pathogénicité : les îlots de pathogénicités PAPI-1 (108 kb) et PAPI-2 (11 kb) qui sont absents de la souche moins virulente PAO1 (He *et al.* 2004).

Les mutants utilisés de la souche PA14 de *P. aeruginosa* sont les suivants : un mutant polaire *pqsB* qui a été créé dans le laboratoire du professeur Déziel par insertion d'un transposon TnpHoA dans le gène *pqsB* et un mutant non polaire *pqsC* qui a été créé dans le laboratoire de la professeure Rahme (Harvard Medical School) par une technique de recombinaison homologue adaptée du système appelé *Red recombinase*, un système disponible commercialement basé sur la recombinaison homologue (Lesic & Rahme 2008).

3.1.2 *Escherichia coli*

Pour les études de biologie moléculaire, les souches SM10 λ pir (*thi-1 thr leu tonA lacY supE recA ::RP4-2-Tc ::Mu Km^r λ pir*) (Funatsu *et al.* 1972) et DH5 α (*supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)* (une souche disponible commercialement chez Invitrogen) de *E. coli* ont été utilisées. Ces souches contiennent plusieurs mutations qui les rendent plus aptes à accepter et conserver l'ADN. Elles sont donc idéales pour les travaux de clonage.

La souche de *E. coli* utilisée pour l'expression et la purification de la protéine recombinante est BL21 (DE3), une souche disponible commercialement. Cette souche a été mise au point à partir de la souche BL21 qui est déficiente pour les protéases Lon et OmpT. Ces protéases ont été inactivées par mutation pour permettre l'accumulation de protéines, ce qui rend la purification de protéines surexprimées possible. Le phage λ DE3 a été ajouté à cette souche pour créer la souche BL21 (DE3). Le génome de ce phage contient le gène pour la polymérase virale T7. Cette adaptation permet à la bactérie de synthétiser en grande quantité des protéines dont le gène a été mis sous le contrôle d'un promoteur T7 lorsqu'induit par l'IPTG.

3.2 Milieux de culture et antibiotiques

3.2.1 Milieux de culture

Pour les cultures liquides, le milieu "tryptic soy broth" ou TSB de marque Difco a été utilisé. C'est un milieu riche qui permet la croissance d'un grand nombre d'espèces bactériennes aussi bien en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies. Le milieu est composé de de soya et de caséine qui ont été soumis à une digestion protéolytique, ces composantes agissant principalement comme source d'azote pour les bactéries. Du dextrose est aussi contenu dans le milieu comme source de carbone ainsi que du chlorure de sodium pour maintenir la balance osmotique et du phosphate de dipotassium comme tampon pour le pH. Lorsque les expériences nécessitaient la croissance de bactéries sur milieu solide, de l'agar était ajoutée au TSB à une concentration de 1.5 % (p/v) avant la stérilisation par autoclave.

3.2.2 Antibiotiques

Des antibiotiques ont été utilisés à plusieurs étapes lors des travaux présentés, dépendamment du gène de résistance présent sur les vecteurs utilisés aux différentes étapes d'expérimentation. La carbénicilline est ajoutée aux milieux de culture à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ pour *E. coli* et une concentration de 300 $\mu\text{g/mL}$ pour les cultures de *P. aeruginosa*. Les gènes de résistance à l'ampicilline offrent aussi une protection contre l'action

de la carbénicilline, mais cette dernière est beaucoup plus stable que l'ampicilline qui se dégrade rapidement lors de l'incubation d'une culture où cet antibiotique a été ajouté.

Un autre antibiotique utilisé lors des travaux est la tétracycline à une concentration de 15 µg/mL pour *E. coli* et 75 µg/mL pour *P. aeruginosa*.

3.3 Conditions de cultures

Sauf pour les expériences où cela est indiqué, les cultures de *E. coli* ainsi que *P. aeruginosa* sont incubées à 37 °C pour simuler les conditions physiologiques. Bien que les deux espèces possèdent la capacité de croître dans une vaste gamme de températures, 37 °C est choisi puisque, pour les espèces utilisées, la croissance dans cette condition est rapide. De plus, les cultures préparées avec les 2 espèces sont incubées avec agitation à environ 250 rpm. Ceci assure une bonne oxygénation des milieux lors de la culture. Puisque les deux espèces sont des bactéries à métabolisme aérobie, ceci améliore grandement la croissance.

3.3.1 Conditions de cultures des expériences de marquages

Lors des expériences de marquage, les cultures étaient faites dans du milieu TSB et le composé était ajouté au début de la culture. Pour ce qui était de l'acide dodécanoïque (marqué et non marqué) la molécule est ajoutée à une concentration de 1 mM, soit la concentration utilisée par Kwan et collaborateurs (Kwan *et al.*, 2011). À cette concentration, l'acide dodécanoïque n'est pas totalement soluble, mais est consommé par les bactéries tout de même. L'acide octanoïque (marqué et non marqué) est ajouté aux mêmes concentrations que l'acide dodécanoïque.

3.4 Biologie moléculaire

3.4.1 Amplification de l'ADN par *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Dans un tube PCR contenant 5 μL de tampon PCR de NewEngland Biolabs (concentré 10x), sont ajoutés 5 μL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) ainsi que 1 μL d'un mélange de dNTP à une concentration de 10 mM, 1 μL de chacune des solutions d'amorces à concentration de 10 pmol/ μL , 1 μL de la solution contenant la TAQ polymérase à une concentration de 0,5 unité/ μL et 1 μL de la matrice d'ADN à amplifier à une concentration appropriée de façon à ajouter entre 50 et 100 ng d'ADN. Le volume de la réaction est complété à 50 μL avec de l'eau distillée. La réaction de PCR est ensuite effectuée selon le cycle suivant :

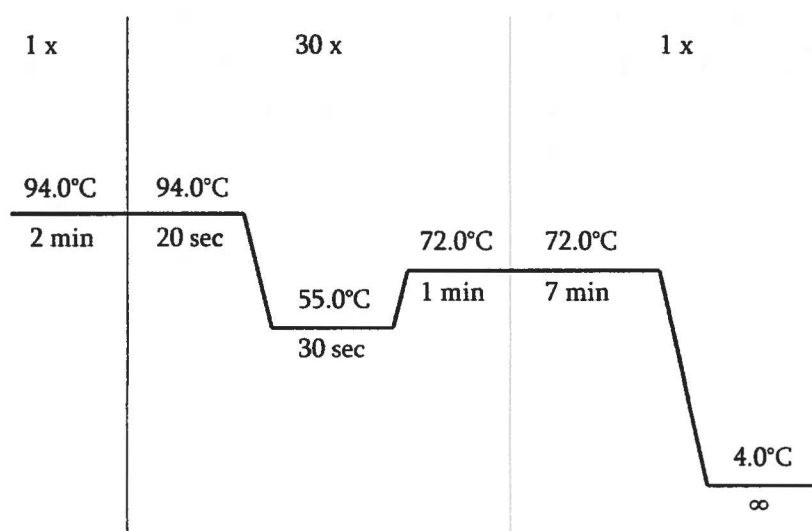


Figure 3.1 Schéma représentatif des températures et temps utilisés lors des réactions de polymérase en chaîne.

Les résultats des PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Les échantillons sont mélangés à un tampon de chargement et soumis à un voltage de 100 V pour la migration. Ils sont ensuite colorés au bromure d'éthidium pendant environ 10 minutes et rincés par la suite dans l'eau pendant 15 minutes. Les bandes sont ensuite visualisées avec un appareil AlphaImager 3400 de Innotech, cet appareil est muni d'une lumière UV et d'une caméra permettant de visualiser l'ADN coloré au bromure d'éthidium. L'échelle moléculaire de référence était l'échelle 1 kb de NewEngland Biolabs.

Bien que les amorces utilisées pour la création des plasmides pMSR1 et pMSR2 soient disponibles, elles ne peuvent pas être utilisées puisqu'elles n'incluent pas l'étiquette hexahistidine, les nucléotides codant pour cette étiquette étaient présents sur le vecteur

initial. Il nous a donc fallu concevoir de nouvelles amorces qui incluent l'étiquette d'hexahistidine dans les nucléotides amplifiés par PCR (voir

Tableau 3.1). Nous avons donc également dû inclure dans les segments amplifiés des sites de digestion présents dans le site de clonage de pDN19. Un site XbaI ayant déjà été ajouté au début des deux gènes lors de la création des plasmides pMSR1 et pMSR2, ce site a été utilisé puisqu'il se retrouve aussi dans le site de clonage de pDN19. Comme il y a un site SacI situé après le site XbaI sur pDN19, ce site a donc été ajouté aux amorces qui viendront amplifier la région contenant la séquence de l'étiquette d'hexahistidine. De cette façon, lorsque les inserts seront digérés de manière à les intégrer au vecteur pDN19, la présence de ces sites assurera que les inserts seront dans le sens approprié pour l'expression après ligation.

Tableau 3.1 Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His*.

Nom de l'amorce	Séquence
Primer His-Tag SacI	GAGCTCTTTGTTAGCAGCCGGATCTC
Primer PqsB 1	GACTTCTAGAATGTTGATTCAGGCTGTGGG
Primer PqsC 1	GACTTCTAGAATGCATAAGGTCAAACCTGGCA

3.4.2 Ligation

Plusieurs réactions de ligation ont été effectuées lors des travaux présentés ici. La ligation a pour but de lier 2 segments d'ADN. Tout d'abord, les gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* amplifiés par PCR ont été ligués dans le vecteur pGEM-T easy. Ces gènes sont ensuite digérés par des enzymes de restriction et ligués dans le vecteur pDN19. Les réactions de ligations sont effectuées dans un tube PCR en ajoutant 5 µL de tampon de ligation rapide Promega (concentré 2x) et 1 µL de la solution contenant l'enzyme DNA ligase isolée du bactériophage T4 à une concentration de 400 000 Unités/mL. Le mélange réactionnel est complété en ajoutant le gène amplifié par PCR et digéré par l'enzyme de restriction ainsi que le vecteur linéarisé par digestion avec la même enzyme. Les concentrations d'ADN ont été mesurées et ajustées dans un rapport de 3 :1 (vecteur : insert), afin d'optimiser l'efficacité de la ligation (Topcu, 2000). La réaction de ligation a été effectuée à 16 °C pendant la nuit. Pour les ligations dans pGEM-T easy, la réaction est similaire, mais les solutions utilisées sont celles disponibles avec le kit commercial. La concentration du stock de T4 DNA ligase dans ce cas est de 3000 Unités/mL.

3.4.3 Digestion

Les enzymes utilisés pour la digestion sont XbaI et SacI. L'enzyme SacI reconnaît et digère l'ADN au site suivant :



L'enzyme XbaI reconnaît et digère l'ADN au site suivant:



Les réactions de digestion ont été effectuées généralement dans un volume total de 50 µL en utilisant le tampon 4 de NewEngland Biolabs qui est compatible avec ces deux enzymes. La concentration a été ajustée à 1X (5 µL de la solution concentrée 10X dans 50 µL). De l'albumine de sérum bovin (BSA) a été ajoutée à la réaction à une concentration finale de 100 µg/mL, de même que 1 µg de l'ADN à digérer. Un volume 1 µL (10 unités) de la solution commercialement disponible de l'enzyme de restriction est ajoutée. Comme une unité est définie comme pouvant digérer 1 µg d'ADN en 60 minutes, l'enzyme est ajouté en excès pour s'assurer que l'ADN sera digéré de manière optimale. La réaction de digestion a été effectuée à 37 °C pendant une heure pour ces 2 enzymes.

3.4.4 Transformation bactérienne

Pour les transformations dans *E. coli*, la méthode de transformation par choc thermique a été utilisée. Les bactéries ont été d'abord cultivées jusqu'à une D.O. (à une longueur d'onde de 600 nm) de 0,5. Les cellules ont ensuite été centrifugées à basse vitesse (3300 x g) pour minimiser le dommage et le stress causés aux les cellules. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans une solution de CaCl₂ (50 mM) et gardées sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont été lavées une seconde fois dans du CaCl₂ à 50 mM et l'ADN à transformer a été ajouté. Le mélange a ensuite été laissé une heure sur glace puis exposé à une température de 42 °C pendant 30-40 secondes. Les bactéries ont ensuite été replacées sur glace pour 2 minutes et transférées dans du TSB pour une heure de croissance à 37 °C. Elles ont été étalées

sur des Pétri de milieux de culture TSB agar avec un antibiotique de sélection. Cette méthode est adaptée de la méthode de Mandel et Higa en 1970 (Mandel & Higa, 1970).

Les transformations dans des souches de *P. aeruginosa* ont plutôt été faites par électroporation. La culture a été centrifugée et les cellules lavées à deux reprises avec une solution de sucrose à 300 mM. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans la solution de sucrose et l'ADN exogène ajouté à la solution. Celle-ci a ensuite été transférée dans une cuvette à électroporation et exposée à un courant électrique de 2500V. La solution a ensuite été transférée dans un tube contenant 1 mL de TSB et incubée 1 heure à 37 °C avant d'être étalée sur un milieu solide contenant les antibiotiques de sélection. Cette méthode est adaptée de Choi *et al.* (Choi *et al.* 2006).

3.4.5 Plasmides utilisés

Les vecteurs pMSR1 et pMSR2 contenant les gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* proviennent du laboratoire de la professeure Rahme. Ces plasmides ont été construits à partir du vecteur pET303 disponible commercialement. Celui-ci est conçu pour l'expression de protéines dans le but de la purification par chromatographie d'affinité au nickel. Le site de clonage est conçu pour ajouter une étiquette d'hexahistidine à l'extrémité C-terminale de la protéine produite. L'expression de cette étiquette nécessite l'élimination du codon-stop présent sur le gène de la protéine à purifier. Par la suite, lors de la traduction, le codon-stop présent sur le vecteur après l'étiquette d'hexahistidine sert à signaler l'arrêt de la synthèse. De plus, le vecteur contient le gène *lacI* et un site *lacO* en amont du promoteur du site de clonage pour le contrôle de l'expression de la protéine. Son expression est activée par l'ajout à la culture d'IPTG, un analogue du galactose. Il y a aussi un promoteur T7 ainsi que le gène pour la T7 ARN polymérase, ce qui assure une forte expression du gène ajouté au vecteur. Un gène de résistance à l'ampicilline est aussi présent sur le vecteur pour faciliter la sélection après une transformation.

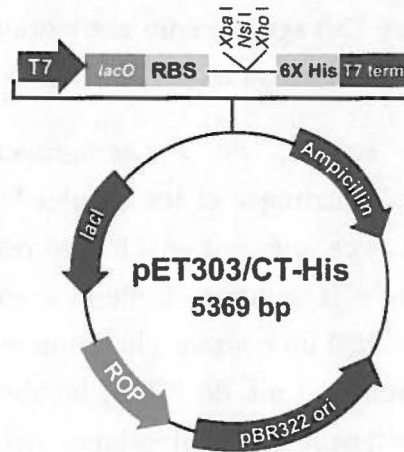


Figure 3.2 Schéma du vecteur pET303/CT-His (Source : Invitrogen)

Le vecteur pGEM-T Easy est un vecteur commercialement disponible qui est utilisé pour faciliter le processus de clonage. Celui-ci a été utilisé comme vecteur de base pour créer les vecteurs pDAF1 et pDAF2. Le plasmide pGEM-T Easy est linéaire et contient des bouts cohésifs thymidine qui permettent la ligation directe de produits de PCR au site de clonage. De plus, le site de clonage est situé dans un gène *lacZ*, donc l'insertion d'un gène dans ce site permet d'effectuer une sélection bleue/blanche sur les colonies obtenues. Le gène de résistance présent sur ce vecteur confère une résistance à l'ampicilline.

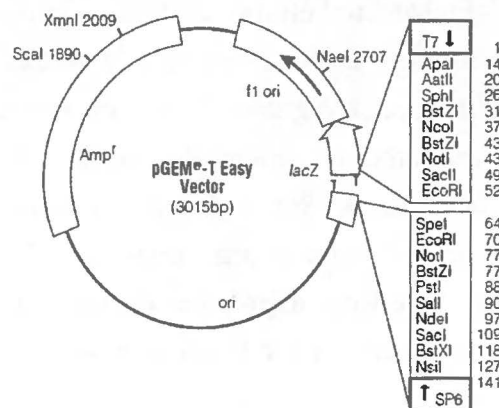


Figure 3.3 Schéma du vecteur pGEM-T Easy (Source : Promega)

Les vecteurs pDAF3 et pDAF4 ont été construits à partir du vecteur pDN19 (Nunn *et al.* 1990). Ce vecteur contient aussi un site de clonage sous le contrôle d'un promoteur T7, mais l'expression de celui-ci n'est pas contrôlée par un site *lacO*. Ce plasmide est donc exprimé

constitutivement. L'origine de réplication du vecteur est reconnue par la machinerie de réplication de *E. coli* ainsi que celle de *P. aeruginosa*. Le gène de résistance présent sur ce vecteur offre une protection à la bactérie contre la tétracycline.

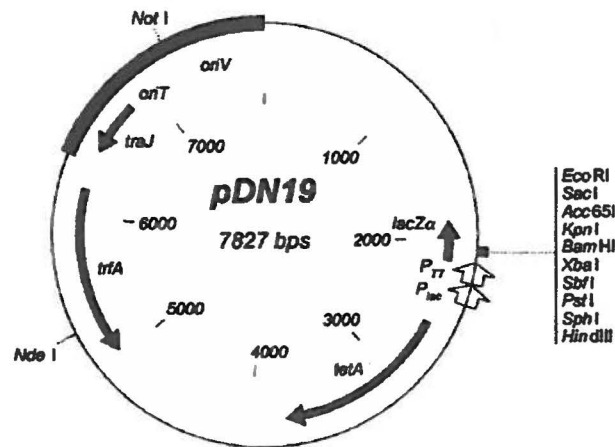


Figure 3.4 Schéma du vecteur pDN19

Source : (Marx & Lidstrom, 2001)

3.4.6 Extractions plasmidiques

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique ont été effectuées avec le kit commercial Wizard *Plus* SV Minipreps de la compagnie Promega. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 250 μ L d'un tampon de resuspension contenant 50 mM de Tris-HCl et 10 mM d'EDTA ainsi que 100 μ g/mL de RNase A pour dégrader l'ARN présent dans les cellules. Un volume de 250 μ L d'un tampon de lyse contenant 0,2 M de NaOH et 1% de SDS est ensuite ajouté aux cellules afin de briser la paroi bactérienne avec environ 250 μ g de la protéase alcaline subtilisine Carlsberg pour dégrader les protéines présentes dans le lysat. Ensuite, 350 μ L de solution de neutralisation qui contient 2.12 M d'acide acétique, 0.759 M d'acétate de potassium et 4.09 M d'hydrochlorure de guanidium a été ajouté pour arrêter les réactions et prévenir la dégradation de l'ADN. Les débris cellulaires ont ensuite été enlevés par centrifugation et l'ADN plasmidique recueilli dans la fraction soluble. Cette solution a été transférée sur une colonne de purification Spin Column (Promega) qui a ensuite été centrifugée. L'ADN plasmidique lié à la colonne a été lavé à plusieurs reprises avec une solution de lavage contenant 8.3 mM de Tris-HCL, 0.04 mM d'EDTA, 60 mM d'acétate de

potassium ainsi que 60% (v/v) d'éthanol. L'ADN plasmidique est élué avec de l'eau libre de nucléase et conservé dans un microtube.

L'ADN plasmidique ainsi obtenu a été visualisé sur gel d'agarose 1 % afin de vérifier la présence ou non de plasmide dans l'éluat et pour déterminer la taille de celui-ci après avoir été linéarisé par digestion avec une enzyme de restriction. Cette vérification est faite en utilisant la méthode décrite précédemment.

3.5 Protéomique

3.5.1 Purification par chromatographie d'affinité avec étiquettes d'hexahistidine

3.5.1.1 Induction de l'expression des protéines avec étiquette d'hexahistidine

Des cultures de *E. coli* BL21(DE3) incorporant les plasmides pMSR1 et pMSR2 ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL préalablement stérilisés contenant 50 mL de TSB à 37 °C et avec agitation (environ 250 rpm). La densité optique à une longueur d'onde de 600 nm a été vérifiée périodiquement jusqu'à une valeur de 0,6 et 0,9. Par la suite, de l'IPTG stérilisé par filtration a été ajouté à la culture à une concentration finale de 1 mM. La culture a ensuite été incubée à 25 °C avec agitation à 250 rpm pendant 3 heures. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1400 x g pendant 30 minutes et congelées à -20 °C après avoir jeté le surnageant.

3.5.1.2 Lyse des cellules

Les cellules sont ensuite resuspendues dans le tampon de lyse commercial BugBuster auquel 50 µg/mL de DNase, 50 µg/mL de RNase et 200 µg/mL de lysozyme ont été ajoutés. Les cellules sont laissées dans le tampon de lyse pendant 30 minutes sur glace. Elles ont ensuite été transférées dans des microtubes avec des billes de verre de 0.1 mm et les tubes placés dans un appareil de brassage à haute vitesse (Fastprep-24 de MPBiomedical) à une vitesse de 4 mètres/s pendant 30 secondes à deux reprises avec 5 minutes de repos entre chaque

brassage. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 16000 x g pour séparer les débris cellulaires du surnageant. Le surnageant provenant de la lyse cellulaire (composé du cytoplasme et de débris membranaires) a été conservée dans un tube Falcon stérile de 15 mL et mélangé avec un volume égal de tampon contenant 20 mM d'imidazole et 600 mM de NaCl (pH 7.5) Ce tampon a pour fonction de diminuer la fixation non spécifique d'autres protéines sur la colonne d'affinité dans les étapes subséquentes.

3.5.1.3 Purification et dessalage des protéines

La colonne de purification est composée de la résine Ni-NTA de QIAGEN. Cette résine est composée d'un complexe nickel-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA) attaché à une résine de sépharose. La purification est possible grâce à l'affinité des résidus histidine de l'étiquette pour le nickel (voir Figure 3.5). Afin d'éviter des liaisons non spécifiques de protéines contenant des résidus histidines, de l'imidazole est ajouté aux échantillons (20 mM) et utilisé pour laver la colonne (10 mM), cette molécule entrant en compétition avec l'histidine pour lier le nickel. La colonne a tout d'abord été équilibrée avec 5 volumes de colonne (10 mL) d'une solution d'imidazole à 10 mM contenant 300 mM de NaCl à pH 7.5. Cette étape ainsi que toutes les étapes subséquentes de la purification ont été effectuées à 4 °C afin de ralentir la dégradation de la protéine surexprimée par des protéases qui pourraient se retrouver dans le lysat. Aucun inhibiteur de protéase n'est ajouté pour éviter l'interférence de telles molécules avec l'activité des protéines purifiées. Le lysat cellulaire a ensuite été ajouté à la colonne, le volume mort récolté et la colonne a ensuite été éluée avec trois volumes de colonne (6 mL) d'une solution à 50 mM d'imidazole et 300 mM de NaCl (pH 7.5) suivi de trois volumes de colonne d'une solution à 100 mM d'imidazole et 300 mM de NaCl (pH 7.5). La protéine purifiée est éluée avec trois volumes de colonnes d'un tampon contenant 250 mM d'imidazole et 300 mM de NaCl, à pH 7.5. Les protéines éluées sont ensuite placées dans un filtre centrifuge Amicon avec des pores de 3 kDa afin d'éliminer l'imidazole et le chlorure de sodium qui pourraient causer des problèmes lors d'étapes subséquentes d'analyse par CL/SM de la protéine. Les filtres Amicon contenu dans des microtubes ont été centrifugés pendant 30 minutes (16 000 x g). La protéine a été rediluée dans 500 µL d'eau stérile Milli-Q et les filtres centrifugés de nouveau pendant 30 minutes. Cette étape de lavage à l'eau a été répétée une deuxième fois, ce qui devrait éliminer 95 % des sels présents dans la solution initiale selon le manufacturier des filtres. La protéine a ensuite été reprise dans 150 µL d'un tampon de conservation (voir appendice A) et conservée à -80 °C.

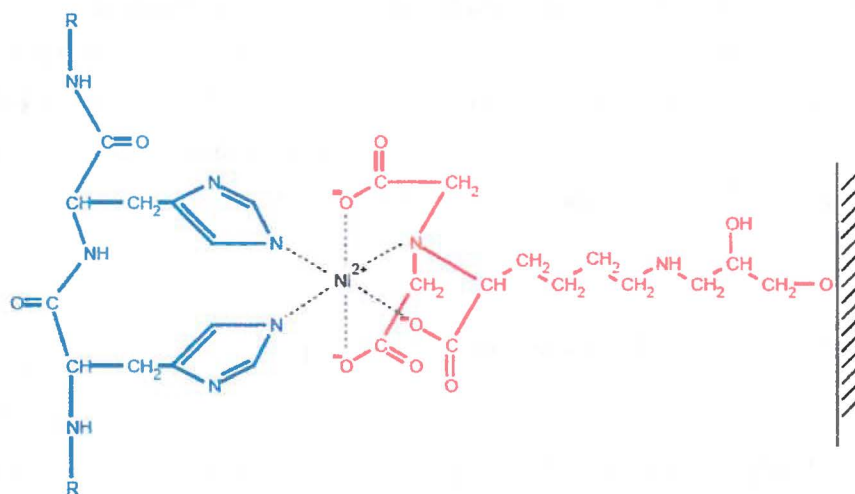


Figure 3.5 Représentation schématique de l'interaction entre les atomes de nickel fixés à la résine et les résidus histidine d'une protéine à purifier. (Source : QIAGEN)

3.5.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique

Les différentes fractions récoltées lors de la purification ont été testées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de dodécylsulfate sodique (SDS-PAGE) selon une méthode adaptée de Laemmli (Laemmli 1970). Les échantillons après avoir été dénaturés dans le tampon de chargement Laemmli (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoethanol, et 0.01% bromophenol blue, pH 6.8), ont été placés sur le gel et la migration a été effectuée avec un tampon Tris-Glycine 1X à un voltage de 200V. Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie ou, alternativement, les protéines ont été transférées sur membrane pour un immunobuvardage de type Western. Pour la coloration, le gel est trempé dans la solution de coloration pendant 30 minutes à température pièce, par la suite il est rincé avec de l'eau distillée et trempé dans une solution de décoloration pendant 1 à 2 heures en changeant la solution de décoloration au besoin.

3.5.3 Immunobuvardage de type Western

Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF)(Trans-Blot Transfer Medium de Bio-Rad, pores de 0,45 μm) en utilisant la méthode de transfert semi-humide à l'aide du Nova-Blot-Multiphor II de GE Healthcare. Pour ce faire, deux papiers Whatman imbibés de tampon de transfert ont été placés sur la cathode de l'appareil et la membrane de PVDF (préalablement activée en la trempant dans le MeOH pendant 1 minute) a été placée sur les papiers Whatman. Le gel est ensuite placé sur la membrane et a été recouvert par un autre papier Whatman imbibé de tampon de transfert. L'appareil est ensuite fermé en fixant l'anode et un courant de 0,8 mA/cm² a été appliqué pendant 1 heure.

Une fois les protéines transférées sur membrane, celle-ci a été trempée dans un volume de solution TBS contenant 3 % d'albumine sérique bovine et laissée dans cette solution pendant une nuit à 4 °C. La membrane a ensuite été trempée dans un volume de solution TBS contenant 3% (p/v) de BSA et 1 $\mu\text{g/mL}$ d'un anticorps primaire (anticorps monoclonaux anti-6HIS de souris produit par Meridian Life Science) qui reconnaît et lie spécifiquement l'étiquette d'hexahistidine présente sur la protéine purifiée pendant une heure à température pièce. Par la suite, la membrane a été lavée avec la solution de lavage. Les détergents présents dans cette solution (le Tween-20 ainsi que le Triton X-100) servent à briser les liens non spécifiques faits par des anticorps, de façon à réduire le signal de fond ainsi que prévenir des signaux faussement positifs. La membrane est ensuite laissée pendant une heure à température pièce dans un volume de solution TBS contenant 3% (p/v) de BSA et 50 ng/mL d'un deuxième anticorps (de lapin du kit ImmunoPure produit par Thermo Scientific) qui se lie spécifiquement aux IgG du premier anticorps. Ce deuxième anticorps est lié à une peroxydase. Une fois le deuxième anticorps fixé, la membrane a été lavée de nouveau pour éliminer les anticorps en surplus et la membrane a été mélangée avec des réactifs de révélation du kit "Supersignal WestPico Mouse IgG Detection Kit". Cette solution de révélation est composée d'un volume égal de "Stable peroxide solution" et "Luminol/Enhancer solution". Ces réactifs sont des substrats de la peroxydase qui génèrent de la chimioluminescence. Les réactifs ont été ajoutés à la membrane et laissés pour 5 minutes et la chimioluminescence visualisée dans un phosphoimager (Typhoon Trio Variable Mode Imager de GE Healthcare). Les bandes observées correspondent aux protéines qui ont une étiquette d'hexahistidine.

3.6 Analyses de CL/SM

L'appareil utilisé pour les analyses de spectrométrie de masse est composé de deux parties : l'appareil de chromatographie en phase liquide de haute performance (CLHP) et le spectromètre de masse (SM). Le CLHP est un appareil qui sert à séparer les différentes molécules qui composent l'échantillon à analyser. Celui utilisé lors des travaux présentés ici est le Waters 2795 Separation Module. Les molécules sont dissoutes dans une phase mobile qui entre en contact avec la phase stationnaire, les différents analytes sont ensuite séparés selon les différentes forces de leurs interactions avec la phase stationnaire. Dans le cas des travaux présentés ici, la chromatographie à phase inverse a été utilisée, c'est donc la phase mobile (solvant) qui était polaire et la phase stationnaire (colonnes de chromatographies) qui était non polaire. Le SM quant à lui permet de séparer et identifier des molécules ionisées selon leurs différents rapports masse sur charge (m/z). Le spectromètre utilisé lors des travaux présentés ici est le Micromass Quattro Premier XE de Waters. Dans cet appareil les molécules sont ionisées par électronébulisation, les ions résultants entrent ensuite dans l'analyseur de masse composé de deux quadripoles en tandem avant d'être acheminés au détecteur.

La durée de la méthode de chromatographie varie selon la colonne utilisée, mais dans tous les cas le gradient d'hydrophobicité du solvant utilisé passe d'une solution aqueuse (Solvant A) à un solvant organique (Solvant B). Un exemple de gradient de solvant est présenté au Tableau 3.2. Les colonnes de chromatographie utilisées étaient des colonnes pour lesquelles la phase stationnaire est composée de molécules de C_8 attachées à des billes de silice. La première colonne utilisée est la Eclipse XDB- C_8 de Agilent (diamètre interne de 4.6 mm x 250 mm, la résine présente une taille des pores de 80 Å et une surface de 180 m²/g, la taille des particules est de 5 µm), par la suite les injections ont été faites avec la colonne C_8 Kinetex de Phenomenex (diamètre interne de 4.6 mm x 100 mm, la résine présente une taille de pores de 100 Å et une surface de 200 m²/g, la taille des particules est de 2.6 µm). Les particules auxquelles est fixée la phase stationnaire possèdent un diamètre plus petit pour cette deuxième colonne. Ceci augmente la surface de contact entre la phase stationnaire et la phase mobile ce qui a pour effet d'augmenter la résolution des pics chromatographiques obtenus. Cette augmentation de résolution apporte une augmentation de la limite de détection et permet de réduire le temps des méthodes de chromatographie.

Tableau 3.2 Exemple de gradient de solvant pour la séparation chromatographique des HAQ

Temps	Proportion de solvant A	Proportion de solvant B
0	70%	30%
30 sec	70%	30%
2 min	40%	60%
4 min	40%	60%
7 min	0%	100%
11 min	0%	100%
12 min	70%	30%
15 min	70%	30%

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode d'électronébulisation positive. L'analyse des HAQ a été effectuée en mode balayage de m/z 130 à 400. Ce mode permet la détection de HAQ de masses différentes lors des expériences de marquage. Lors de l'analyse des HSL, une analyse en MRM (multiple reaction monitoring) a plutôt été favorisée. Cette méthode consiste à sélectionner certains rapports m/z spécifiques, les ions correspondants à ce rapport sont soumis à une fragmentation et un ion spécifique résultant de cette fragmentation est suivi. Cette technique permet d'augmenter le rapport signal/bruit de fond ce qui abaisse considérablement la limite de détection. Par contre, lors des expériences de marquage, les HSL ont été analysés par balayage de m/z 130 à 400 de façon à pouvoir détecter les HSL avec des masses différentes. En effet les HSL marqués ne seraient pas détectés par une méthode MRM puisque le rapport m/z des fragments de ces HSL serait différent.

Pour les analyses de HAQ, 300 μ L de MeOH contenant 5 ppm de standard interne ont été ajoutés à 300 μ L de culture. Le standard interne utilisé dans la plupart des cas était le HHQ-d4 (Lépine *et al.* 2003). La différence de masse permet de différencier le HHQ produit naturellement du HHQd4. La solution résultante a été vortexée pendant 10 secondes et ensuite centrifugée à 16 000 x g pendant 10 minutes. Un volume de 500 μ L du surnageant résultant a été transféré à une fiole de CL/SM et entreposé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

Pour l'analyse des HSL, l'extraction a été effectuée en ajoutant 1.5 mL d'acétate d'éthyle à 3 mL de culture bactérienne ainsi que du standard interne HHQd4 pour une concentration finale de 5 ppm dans un tube Falcon de 15 mL. La solution résultante est mélangée de manière à ne pas créer d'émulsion. Le tube est ensuite centrifugé à 1400 x g pendant 15 minutes pour accélérer la séparation de phase. La phase hydrophobe est ensuite recueillie dans un tube de verre. Le processus est répété avec le reste de la culture bactérienne et la phase hydrophobe de cette nouvelle extraction est mise en commun avec celle de l'extraction précédente. Le solvant qui compose la phase hydrophobe est ensuite évaporé à l'aide d'un jet d'azote. L'échantillon au fond du tube est resuspendu dans 300 µL de solvant B avant injection au CL/SM.

4 RÉSULTATS

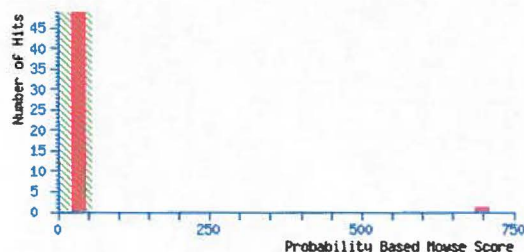
4.1 PqsD

4.1.1 Purification de la protéine PqsD-6His.

La protéine PqsD a été purifiée et son activité enzymatique de synthèse du DHQ a été vérifiée *in vitro* conformément aux travaux de Zhang et collaborateurs (Zhang *et al.* 2008). Le vecteur utilisé, pET28a, ajoute une étiquette d'hexahistidine en N-terminal de la séquence d'acides aminés de la protéine. Une fois le vecteur acquis du laboratoire du professeur Charles Rock (St. Jude Children's Research Hospital, TN, USA), la protéine a été exprimée et purifiée avec le protocole contenu dans l'article. La purification a été faite par chromatographie d'affinité au nickel. La protéine PqsD-6His a été purifiée avec succès et son identité a été confirmée par immunobuvardage de type Western avec des anticorps anti-étiquette d'histidine ainsi que par digestion tryptique suivie de séquençage par CL/SM/SM (voir Figure 4.1, Figure 4.2 et Figure 4.3). Une quantité importante de protéine a été purifiée, une concentration de 0,6 mg/mL de protéine ayant été obtenue (Nanodrop, DO₄₂₀). L'activité de la protéine a été vérifiée en mélangeant de l'anthranoyl-CoA à du malonyl-CoA dans un tampon Tris-HCl (pH 7.5), en ajoutant la protéine PqsD-6His à la solution et en laissant réagir 30 minutes à 37°C. L'échantillon a ensuite été analysé par CL/SM et du DHQ a été détecté indiquant que la protéine purifiée est fonctionnelle (voir Figure 4.4). Les échantillons ont aussi révélé la présence de 2-aminoacétophénone (2-AA) (Figure 4.5), un produit dérivé apparenté à la synthèse des HAQ (Mann 1966 ;Cox & Parker 1979).

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 55 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

1. [gi1258588443](#) Mass: 38688 Score: 697 Queries matched: 23

Chain A, Crystal Structure Of Pseudomonas Aeruginosa PqsD In A Covalent Complex With Anthranilate

☒ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
31	449.24	896.47	897.54	-1.07	0	19	2.1e+002	2	GQILAGLAR
32	482.13	962.25	961.57	0.67	0	27	42	2	HIFVLDIR
☒ 81	641.64	1281.26	1281.71	-0.45	0	(46)	0.44	1	HVLVVCGEVLSK
☒ 91	661.64	1321.27	1321.65	-0.38	0	(62)	0.0099	1	INTSDEFIVER
☒ 92	661.65	1321.29	1321.65	-0.36	0	82	0.00012	1	INTSDEFIVER
93	1322.58	1321.58	1321.65	-0.07	0	(37)	3.3	2	INTSDEFIVER
94	662.10	1322.18	1321.65	0.53	0	(23)	77	2	INTSDEFIVER
☒ 95	662.14	1322.26	1321.65	0.61	0	(77)	0.00031	1	INTSDEFIVER
☒ 96	662.15	1322.28	1321.65	0.63	0	(39)	2	1	INTSDEFIVER
☒ 97	670.17	1338.32	1338.73	-0.41	0	78	0.00029	1	HVLVVCGEVLSK + Carbamidomethyl (C)
☒ 98	670.18	1338.35	1338.73	-0.39	0	(75)	0.0005	1	HVLVVCGEVLSK + Carbamidomethyl (C)
☒ 99	670.67	1339.33	1338.73	0.59	0	(49)	0.2	1	HVLVVCGEVLSK + Carbamidomethyl (C)
☒ 118	499.50	1495.48	1494.83	0.64	1	74	0.00064	1	HVLVVCGEVLSKR + Carbamidomethyl (C)
120	755.19	1508.37	1507.78	0.59	0	(20)	1.6e+002	5	AQTSGLLYGLQMAR
☒ 133	784.21	1566.41	1566.76	-0.36	0	59	0.022	1	AQCSGLLYGLQMAR + Carbamidomethyl (C)
☒ 135	524.21	1569.60	1569.80	-0.20	0	32	9.2	1	AQYSGLLYGLQMAR
☒ 141	543.55	1627.63	1627.83	-0.20	0	57	0.029	1	GRPMFEHASQTLVR
☒ 150	844.71	1687.40	1687.93	-0.53	0	91	1.3e-005	1	ILDAVQEQLGIPQHK
☒ 151	563.91	1688.70	1687.93	0.78	0	(49)	0.19	1	ILDAVQEQLGIPQHK
☒ 177	984.20	1966.38	1966.99	-0.61	0	100	1.2e-006	1	YHVEPEQAVSALMVPAAR
☒ 178	657.16	1968.46	1966.99	1.47	0	(81)	9.9e-005	1	YHVEPEQAVSALMVPAAR
☒ 198	742.20	2223.58	2224.14	-0.57	1	79	0.00015	1	TRYHVEPEQAVSALMVPAAR
☒ 199	557.19	2224.74	2224.14	0.60	1	(64)	0.0042	1	TRYHVEPEQAVSALMVPAAR

Figure 4.1 Résultat de séquençage après digestion tryptique de la bande obtenue sur gel de polyacrylamide correspondant à la protéine PqsD-6His

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 28%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 GSHMASMTGG QQMGRGSENLYFQGNPILAG LGFSLPKRQV SNHDLVGR**IN**
51 **TSDEFIVERT** GVR**TRYHVEP** **EQAVSALMVP** **AARQAIEAAG** LLPEDIDLLL
101 VNTLSPDHHD PSQACLIQPL LGLRHIPVLD **IRAQXSGLLY** **GLQMARGQIL**
151 **AGLARHVLVV** **CGEVLSKRMD** CSDRGRNLSI LLGDGAGAVV VSAGESLEDG
201 LLDLRLGADG NYFDLLMTAA PGSASPTFLD ENVLREGGGE FLMR**GRPMFE**
251 **HASQTLVRIA** GEMLAHELT LDDIDHVICH QPNLR**ILDAV** **QEQLGIPQHK**
301 FAVTVDR LGN MASASTPVTL AMFWPDIQPG QRVLVLTYGS GATWGAALYR
351 KPEEVNRPC

Nominal mass (Mr): 38688; Calculated pI value: 5.43

Figure 4.2 Peptides tryptiques observés lors du séquençage de PqsD-6His

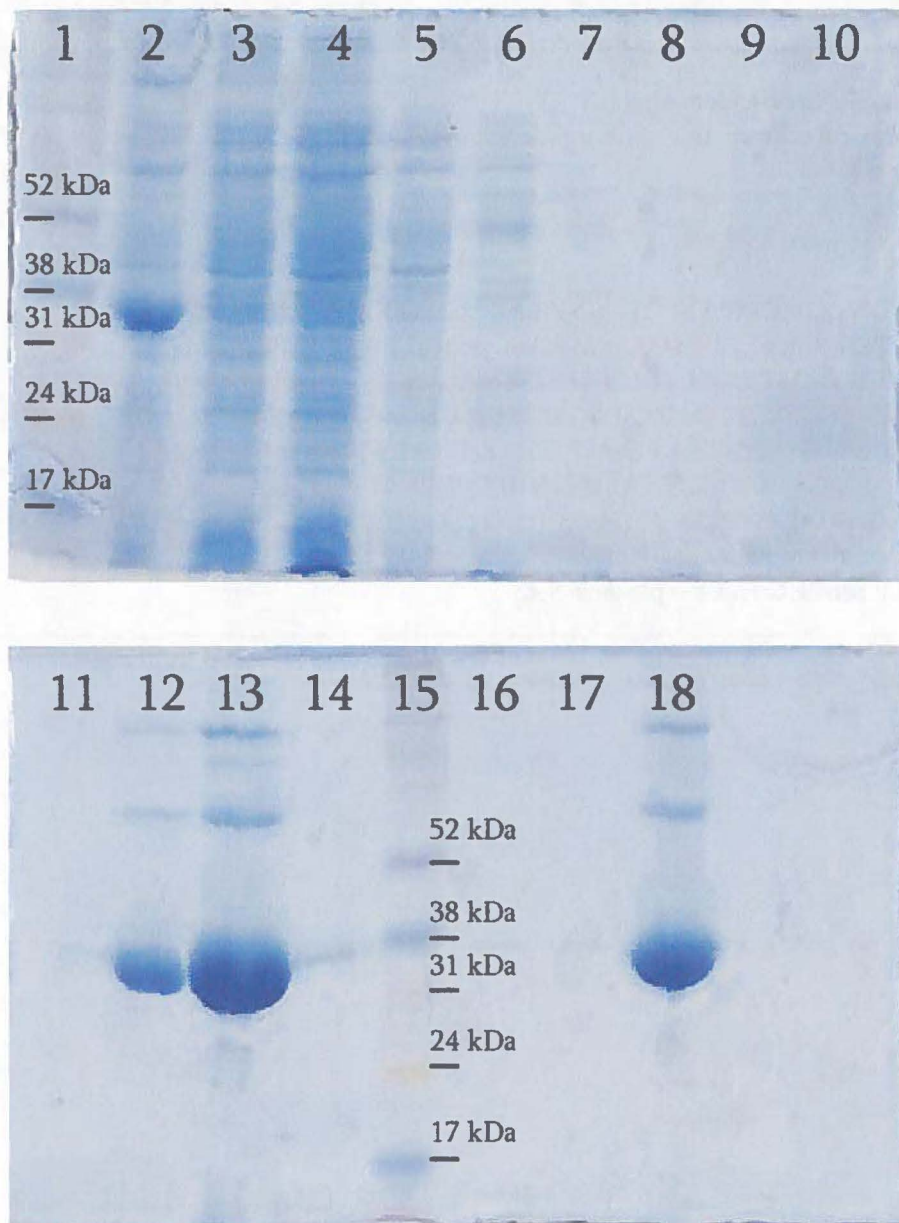


Figure 4.3 Gel de polyacrylamide issu d'une purification de la protéine PqsD-6His coloré au Bleu de Coomassie. 1,15 : Échelle moléculaire protéique (Rainbow Full-Range de Biorad), 2 : Surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pET28aPqsD-6His après induction (1 mM d'IPTG), 3 : Fraction du surnageant (cytoplasme) qui est récolté après un passage dans la colonne de résine de nickel, 4,5,6,7 : Fractions récupérées après lavage de la colonne avec 1 volume de colonne (2 mL) de tampon 50 mM imidazole 300 mM NaCl, 8,9,10,11 : Fractions récupérées après lavage de la colonne avec 1 volume de colonne (2 mL) de tampon 100 mM imidazole 300 mM NaCl, 12,13,14,16,17 : Fractions d'élutions récupérées après lavage de la colonne avec 1 volume de colonne (2 mL) de tampon d'élution (250 mM imidazole 300 mM NaCl), 18 : Fraction correspondant au 2^e volume de colonne de tampon d'élution (250 mM imidazole 300 mM NaCl) (échantillon correspondant à celui du puits 13) après un changement de tampon par méthode de filtre centrifuge de type Amicon (3 kDa CO), comme décrit dans la section matériel et méthodes.

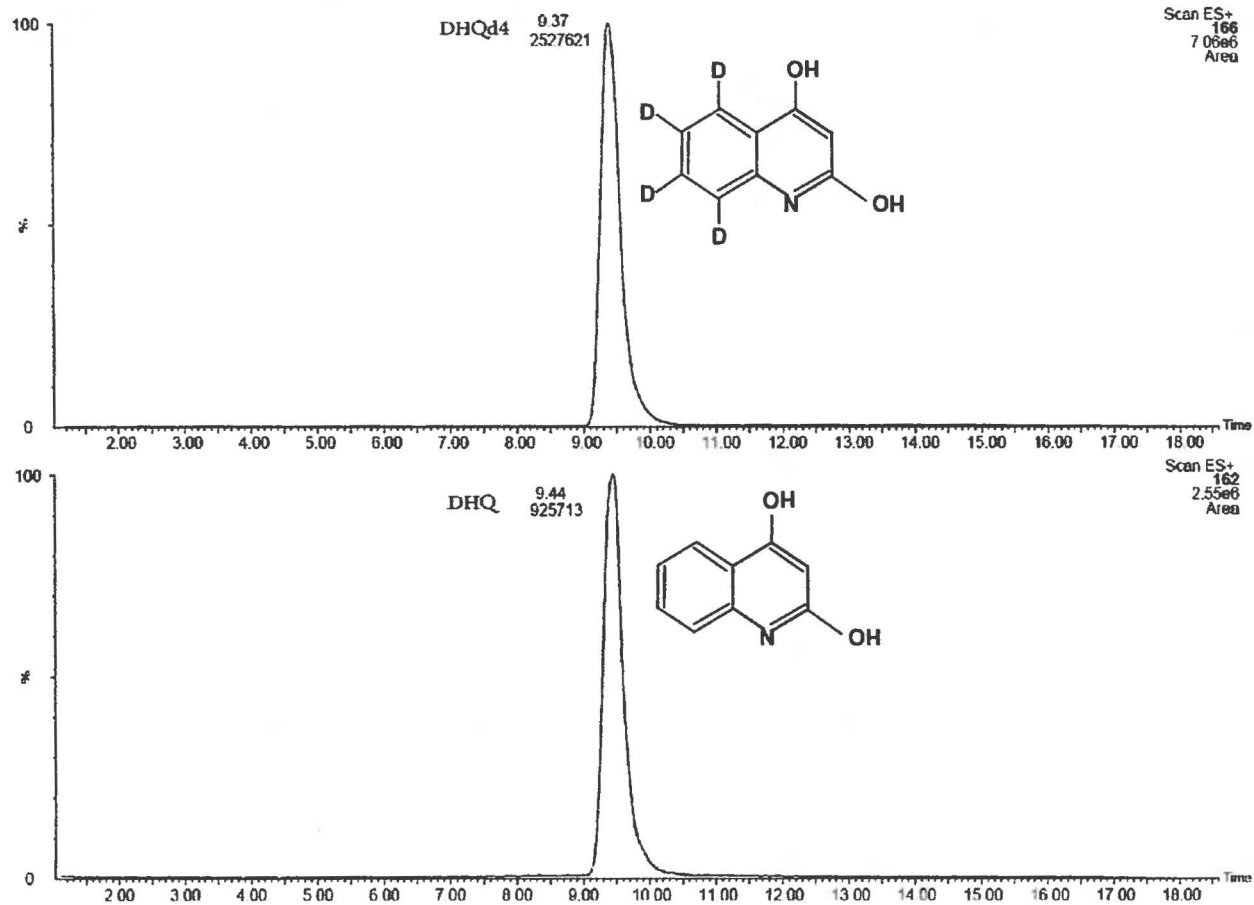


Figure 4.4 Chromatogramme du DHQ produit par la protéine PqsD-6His *in vitro* ainsi que celui du standard interne (DHQd4) utilisé

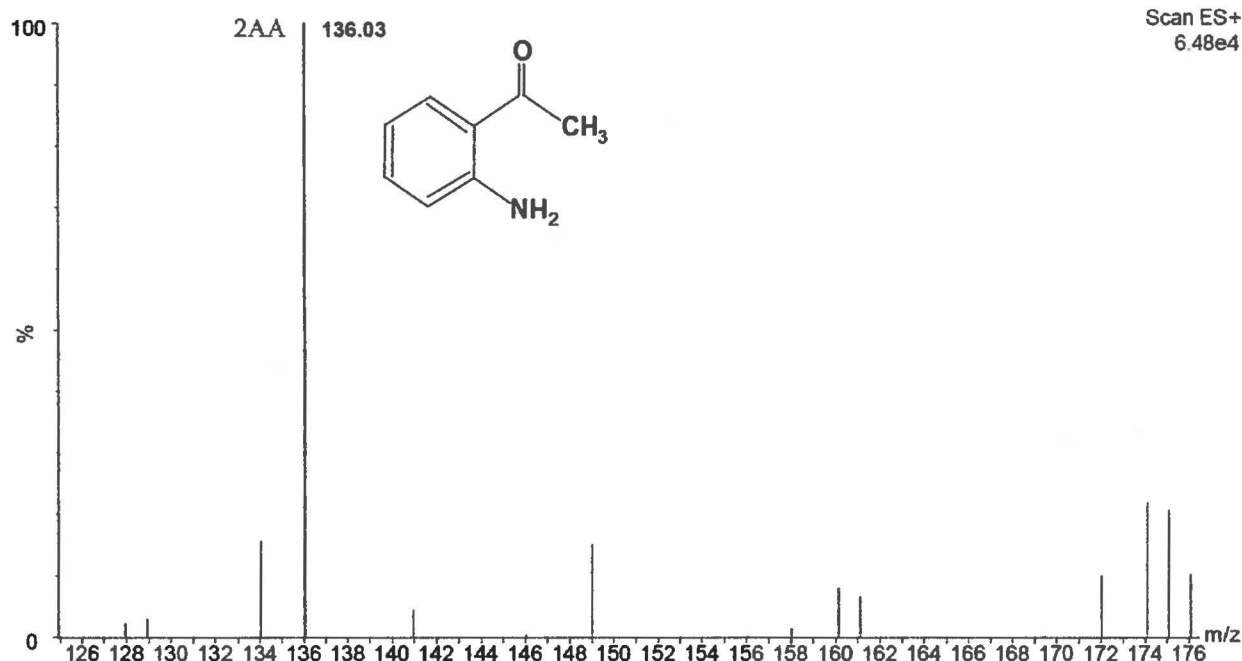


Figure 4.5 Spectre du 2AA observé lors de la synthèse *in vitro* du DHQ par la protéine PqsD-6His

4.2 Expression des protéines PqsB-6His et PqsC-6His chez *E. coli* BL21(DE3) à partir des plasmides pMSR1 et pMSR2.

4.2.1 Confirmation de la présence de l'étiquette d'hexahistidine par immunobuvardage de type Western.

Les plasmides dans lesquels se trouvent les gènes encodant les protéines PqsB et PqsC contiennent les nucléotides nécessaires pour ajouter une étiquette d'hexahistidine à ces protéines. En effet, les plasmides pMSR1 (PqsB-6His) et pMSR2 (PqsC-6His) ont été construits à partir du vecteur pET303-CTHis dans le laboratoire du Professeur Rahme (Harvard Medical School, Boston). Ce plasmide ajoute donc l'étiquette d'hexahistidine en C-terminal de la protéine. De plus, l'expression des gènes ajoutés à ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur *lacO* ce qui permet d'ajuster le niveau d'expression de la protéine exprimée, comme expliqué dans la section 3.4.5.

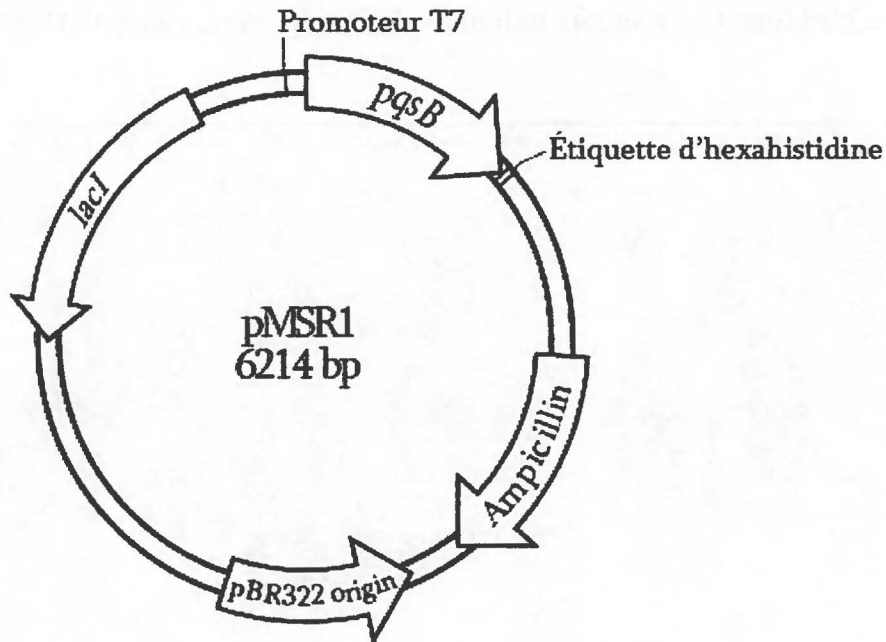


Figure 4.6 Schéma du vecteur pMSR1 obtenu de Mélissa Starkey (Harvard Medical School)

Les plasmides pMSR1 et pMSR2 ont donc été transformés dans la souche BL21(DE3) de *E. coli* et leur présence a été confirmée par extraction plasmidique et vérification sur gel d'agarose.

Des cultures ont ensuite été préparées pour chaque transformation et l'expression des gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* a été induite par l'ajout d'IPTG aux cultures. Un échantillon a été pris avant l'ajout de l'IPTG et par la suite un échantillon a été pris à chaque heure pour 3 heures. Les cellules ont ensuite été centrifugées, lysées et mélangées à du tampon de chargement pour électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF. La membrane a tout d'abord été colorée avec une méthode non-spécifique de protéines (BLOT FastStain de G-Biosciences). Par la suite, elle a été décolorée avec de l'eau et une révélation colorimétrique avec des anticorps spécifiques à l'étiquette hexahistidine a été faite.

Les résultats montrent qu'une protéine apparaît après l'induction à l'IPTG dans les bactéries contenant chacun des plasmides (pMSR1 et pMSR2) (Figure 4.7). Ces protéines ne sont pas présentes dans les lysats avant induction, ni dans le contrôle de *E. coli* BL21(DE3) pET303-CTHis. De plus, ces mêmes protéines ont été détectées par les anticorps spécifiques aux

étiquettes d'hexahistidine. Ces résultats indiquent que ces protéines sont PqsB-6His et PqsC-6His.

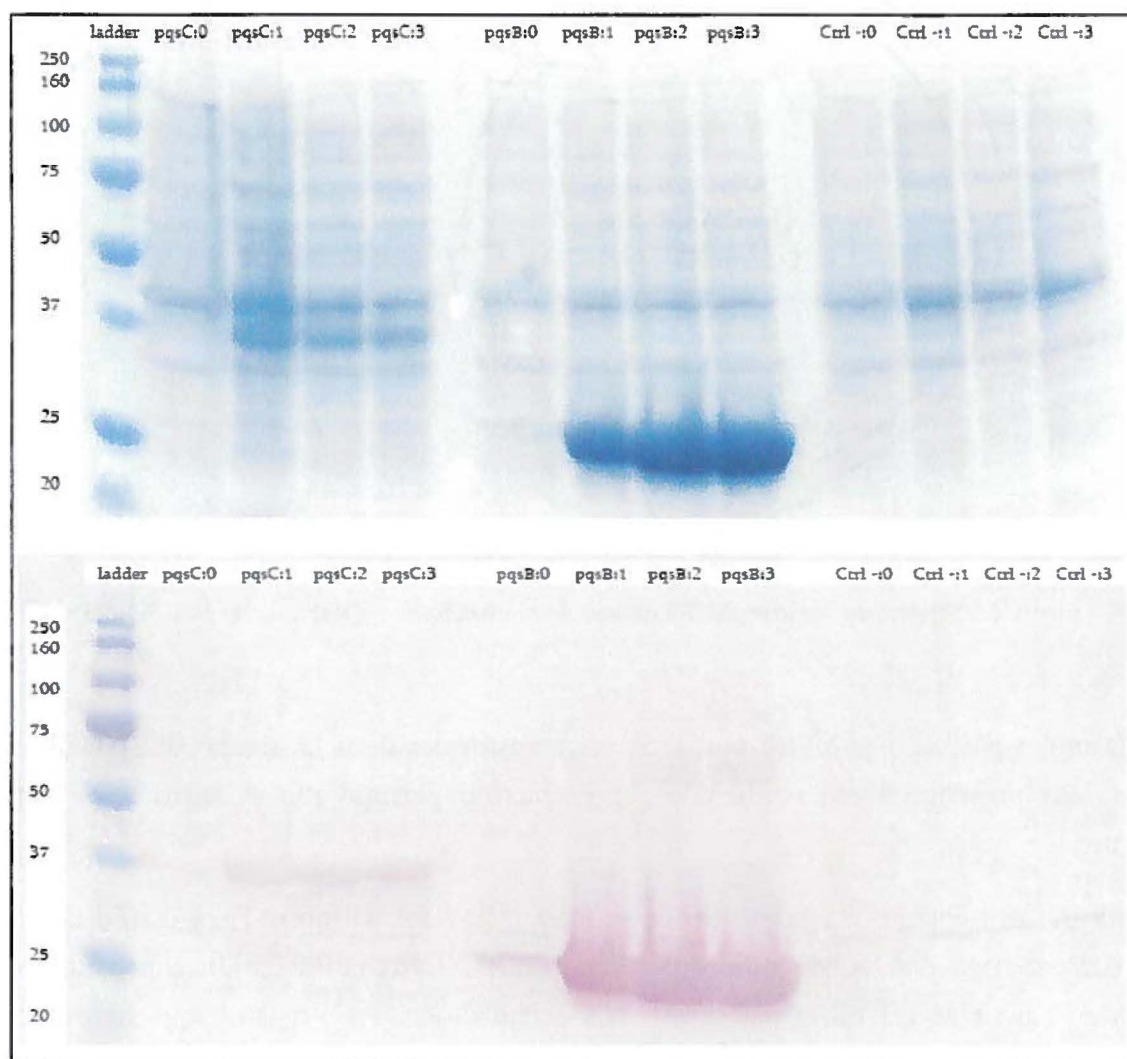


Figure 4.7 Expression des protéines PqsB-6His et PqsC-6His chez *E.coli* BL21(DE3). La photo du haut est une membrane où les protéines ont été colorées de manière non spécifique (BLOT FastStain de G-Biosciences), les 3 souches testées sont *E. coli* BL21(DE3) pMSR2, *E. coli* BL21(DE3) pMSR1, *E. coli* BL21(DE3) pET303. La photo du bas est de la même membrane testée avec des anticorps spécifiques aux étiquettes hexahistidines.

4.3 Vérification de la fonctionnalité des protéines PqsB-6His et PqsC-6His par clonage des gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* dans le vecteur pDN19 et transformation dans des mutants de PA14 pour complémentation.

4.3.1 Amplification et ligation des gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His*

Nous avons vérifié si les protéines produites à partir des gènes ajoutés aux vecteurs pMSR1 et pMSR2 sont fonctionnelles, car il est possible que l'étiquette d'hexahistidine ajoutée aux protéines interfère avec l'activité de celles-ci. Il est également possible qu'une erreur lors de la construction des vecteurs ou bien une mutation rende les protéines inactives. Pour ce faire, nous avons exprimé chacune des protéines 6His-tag chez un mutant de *P. aeruginosa* où le gène de la protéine correspondante est muté de façon non polaire pour ensuite vérifier s'il y a production de HAQ. Cependant, le vecteur utilisé pour construire pMSR1 et pMSR2, soit pET303-CTHis, contient une origine de répllication qui n'est pas reconnue chez *P. aeruginosa* PA14. Les plasmides pMSR1 et pMSR2 ne peuvent donc pas se répliquer chez cette bactérie. Il était donc nécessaire de cloner les gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* dans un vecteur pouvant se répliquer chez PA14. Le vecteur choisi est pDN19 qui contient une origine de répllication qui est reconnue tant par *P. aeruginosa* que par *E. coli* BL21(DE3). De plus, le promoteur au site de clonage a une expression constitutive moins forte que le promoteur de pET303-CTHis, ce qui devrait diminuer les probabilités de poser problème avec la surexpression des protéines à purifier.

Une PCR est donc effectuée avec des amorces pouvant amplifier les gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His* et les inserts ont ensuite été intégrés dans le vecteur pGEM-T-easy, créant les vecteurs pDAF1 (qui contient *pqsB-6His*) et pDAF2 (qui contient *pqsC-6His*). Puisque ce vecteur se réplique en plusieurs copies chez *E. coli*, il permet l'amplification du matériel génétique après que celui-ci soit transformé chez *E. coli* SM10.

4.3.2 Digestion et ligation dans pDN19 des gènes *pqsB-6His* et *pqsC-6His*.

Une extraction plasmidique a été faite sur des souches contenant pDAF1 et pDAF2. Les plasmides purifiés ont ensuite été digérés avec les enzymes SacI et XbaI de façon à libérer les

inserts. En parallèle, le plasmide pDN19 a été digéré avec les mêmes enzymes de façon à rendre le vecteur linéaire. Les inserts ont ensuite été intégrés séparément dans le vecteur pDN19 linéarisé pour créer les vecteurs pDAF3 (qui contient *pqsB-6His*) et pDAF4 (qui contient *pqsC-6His*). Ceux-ci ont ensuite été transformés par choc thermique dans *E. coli* SM10 pour faciliter la vérification de la présence de l'insert dans les plasmides puisque cette transformation est plus simple chez *E. coli* que chez *P. aeruginosa*.

4.3.3 Transformation dans les mutants de *P. aeruginosa* et vérification de la complémentation.

Le plasmide pDAF3 a été transformé par électroporation dans le mutant *pqsB* de la souche PA14 de *P. aeruginosa*. Ce mutant est censé porter une mutation polaire pour ce gène, mais des tests effectués précédemment suggèrent que la mutation est en fait non polaire et qu'une partie de l'activité de l'opéron peut être restaurée par l'ajout d'une protéine PqsB fonctionnelle. Le plasmide pDAF4 a été transformé par électroporation dans le mutant *pqsC* non polaire de la souche PA14 de *P. aeruginosa*.

Ces souches ont ensuite été mises en culture avec de la tétracycline de façon à maintenir les plasmides et lorsque qu'une densité cellulaire suffisante a été atteinte, les cellules ont été centrifugées et lysées. Le résultat de la transformation a été vérifié par immunobuvardage de type Western de façon à confirmer l'expression des plasmides et la synthèse des protéines à étiquettes d'hexahistidine chez *P. aeruginosa* PA14. La présence des deux protéines a été confirmée dans la fraction soluble de *P. aeruginosa* PA14.

Les surnageants de ces cultures a ensuite été extrait au méthanol auquel on a ajouté du HHQ-d4 (comme standard interne). Les surnageant extraits ont été analysés par CL/SM pour vérifier la production de HAQ. Une production de HAQ chez les mutants non polaires de PA14 contenant les plasmides pDAF3 et pDAF4 indiquerait que les protéines produites à partir des gènes sur les plasmides sont fonctionnelles et complémentent la mutation.

Un surnageant extrait du mutant *pqsB* de PA14 sans plasmide (contrôle négatif), ne contenait aucun HAQ. Par contre, le surnageant du mutant *pqsB* de PA14 avec le plasmide pDAF3 contenait bel et bien des HAQ, bien qu'en quantité moindre que chez la souche sauvage. Ceci confirme donc que la protéine est fonctionnelle malgré la présence de l'étiquette d'hexahistidine (voir Figure 4.8)

Par contre, le surnageant du mutant *pqsC*⁻ non polaire de PA14 complémenté avec le plasmide pDAF4 ne présentait aucune trace de HAQ. Ceci démontre que la protéine PqsC-6His n'est pas fonctionnelle.

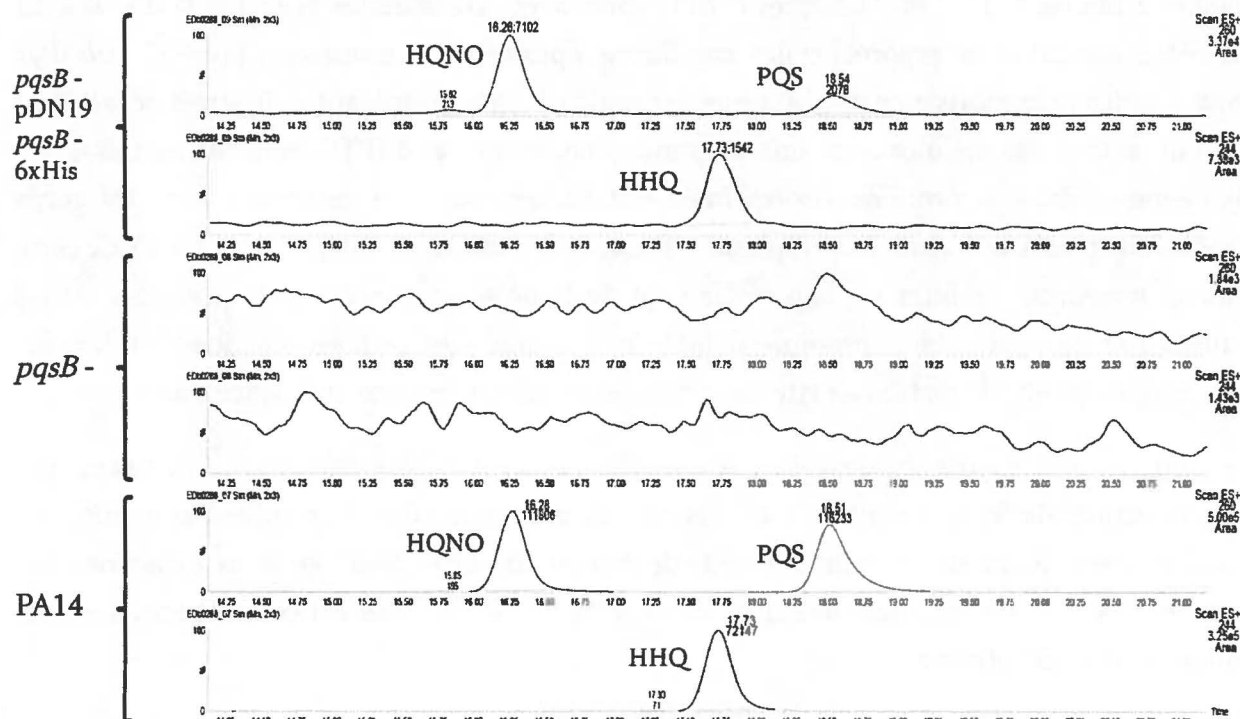


Figure 4.8 Complémentation du mutant *pqsB* par pDAF3. Les deux premiers spectres représentent le HHQ, le PQS et le HQNO produits par le mutant complémenté. Les deux spectres suivants montrent l'absence de HAQ dans le mutant *pqsB* et les deux derniers spectres montrent la production de HHQ, PQS et HQNO dans la souche sauvage.

4.4 Mise au point du protocole de purification de PqsB-6His par chromatographie d'affinité.

Comme pour l'expérience avec *pqsD*, la purification des protéines avec étiquettes d'hexahistidine a été effectuée par chromatographie d'affinité avec des colonnes de résine associée à des atomes de nickel.

Avant de procéder à la purification, les conditions optimales d'expression des protéines à purifier doivent être trouvées. Les protéines PqsB et PqsC sont prédites comme étant des protéines cytoplasmiques chez *P. aeruginosa*, et devraient normalement se retrouver dans le

cytoplasme de *E. coli* BL21(DE3). Cependant, certaines protéines cytoplasmiques surexprimées peuvent se retrouver dans des corps d'inclusion chez cette bactérie.

Différentes conditions d'incubation pour l'induction ont été testées. Les cellules ont été laissées 2 heures à 37°C et 24 heures à 25°C après avoir été induites avec 1 mM d'IPTG. La première condition se rapproche des conditions optimales de croissance pour *E. coli*. Par contre, puisque la croissance des bactéries est rapide à cette température, le stress occasionné par l'induction des cellules avec une si grande concentration d'IPTG pourrait entraîner un changement dans la protéine surexprimée qui l'amènerait à se retrouver dans les corps d'inclusion plutôt que dans le cytoplasme. Puisque la croissance est plus lente à 25°C, cette condition pourrait faciliter un bon repliement de la protéine surexprimée et augmenter les probabilités de retrouver la protéine dans le cytoplasme. Les cellules ont donc été laissées plus longtemps en incubation à cette température en raison de cette croissance plus lente.

Les cellules ont ensuite été lysées et le cytoplasme a été séparé des corps d'inclusion par centrifugation, de façon à vérifier la localisation de la protéine dans la cellule. Par la suite, les corps d'inclusion ont été solubilisés à l'aide de détergents et de chauffage et les 2 fractions ont été vérifiées avec un immunobuvardage de type Western avec des anticorps spécifiques aux étiquettes d'hexahistidine.

Les résultats (voir Figure 4.9) pour PqsB-6His montrent que bien qu'une partie de la protéine produite se retrouve dans les corps d'inclusion, elle est également retrouvée dans le cytoplasme lorsque la température d'incubation après induction était de 25°C. À 37°C PqsB-6His est seulement retrouvée dans les corps d'inclusion. Pour PqsC-6His, la protéine n'est retrouvée que dans les corps d'inclusion et s'avère être insoluble dans les conditions testées.

Suite à ces résultats et ceux qui révèlent la non-fonctionnalité de PqsC-6His, les travaux sur PqsC-6His ont été abandonnés. La suite de mes travaux ne portera donc que sur la purification et la caractérisation de la protéine PqsB-6His.

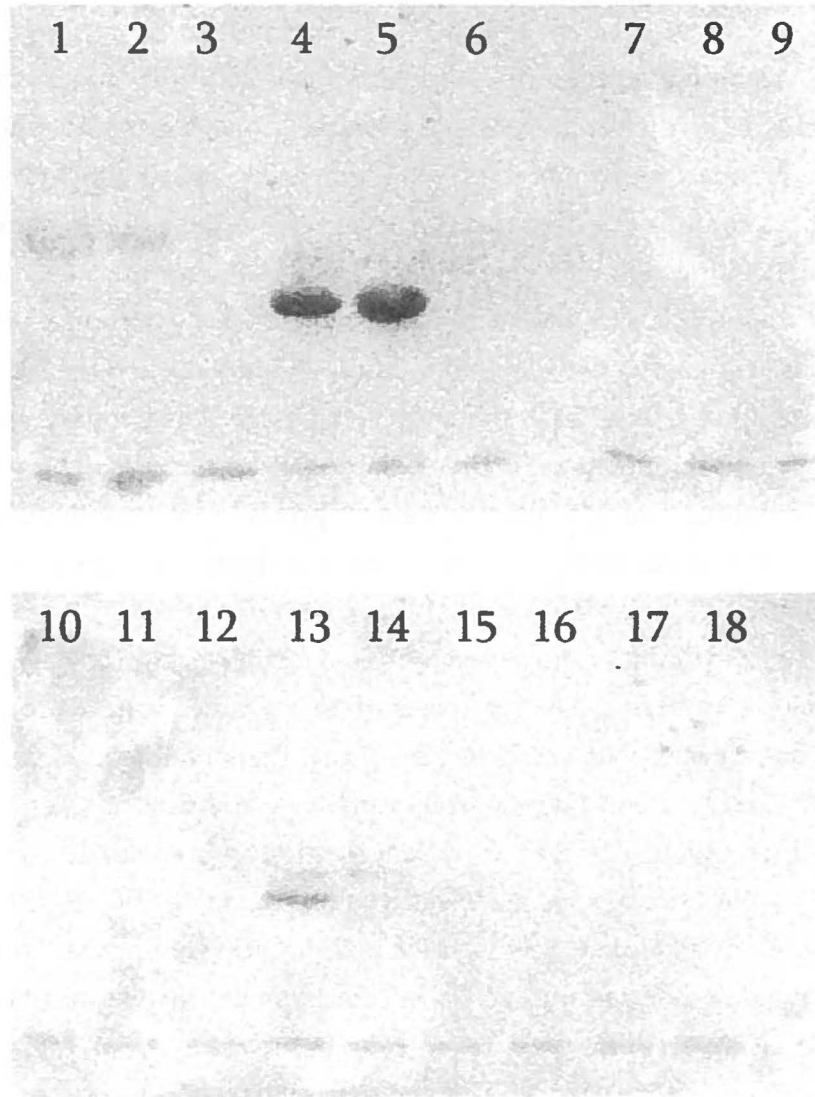


Figure 4.9 Résultats de l'immunobuvardage de type Western pour déterminer les conditions optimales d'induction pour l'expression de PqsB-6His et PqsC-6His. 1 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 induit 24h à 25°C, 2 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 induit 2h à 37°C, 3 : culot de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 avant induction. 4 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit 24h à 25°C, 5 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit 2h à 37°C, 6 : culot de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 avant induction. 7 : culot de *E. coli* BL21(DE3) pET303 induit 24h à 25°C, 8 : culot de *E. coli* BL21(DE3) pET303 induit 2h à 37°C, 9 : culot de *E. coli* BL21(DE3) pET303 avant induction. 10 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 induit 24h à 25°C, 11 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 induit 2h à 37°C, 12 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR2 avant induction. 13 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit 24h à 25°C, 14 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit 2h à 37°C, 15 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 avant induction. 16 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pET303 induit 24h à 25°C, 17 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pET303 induit 2h à 37°C, 18 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pET303 avant induction.

Pour la purification, plusieurs paliers de concentration d'imidazole ont été testés de manière à vérifier la force des interactions entre la protéine PqsB-6His et la colonne de nickel. Cette étape a aussi permis de vérifier la présence de protéines contaminantes se liant à la colonne de nickel. Pour le premier essai, deux solutions d'imidazole ont été préparées, une à 20 mM et une à 250 mM. La solution de 20 mM sert à laver la colonne et à décrocher les protéines qui restent liées à la colonne en raison de faibles interactions avec cette dernière. La solution à 250 mM est le tampon d'élution. Cette concentration est suffisante pour déloger les protéines portant une étiquette d'hexahistidine. Cinq volumes de colonne (soit 5 mL) ont été élués de la colonne après que le lysat cellulaire soit chargé. Les fractions récoltées ont été analysées sur gel de polyacrylamide. Une fois coloré, le gel a montré que PqsB est élué de la colonne à l'étape d'élution, mais que plusieurs autres protéines résistaient au lavage à 20 mM d'imidazole et sont retrouvées dans la fraction d'élution. Pour remédier à cela, des tampons de lavages ont été préparés à 50 mM et à 100 mM d'imidazole. Avec ces nouveaux lavages de la colonne, seulement 4 volumes de colonne ont été nécessaires pour chaque tampon (4 mL). Ces concentrations en imidazole n'étaient pas suffisantes pour éluer la protéine, mais elles étaient suffisamment élevées pour décrocher des protéines contaminantes qui restaient dans la colonne après le lavage à 20 mM d'imidazole. Après ces modifications, la protéine marquée a été éluee seulement (voir Figure 4.10). Dans le protocole final, le tampon à 20 mM d'imidazole n'a plus été utilisé puisque les deux autres tampons (50 mM et 100 mM) sont suffisants pour nettoyer la colonne de protéines indésirables. De plus, seulement 3 volumes de colonne de chaque tampon se sont avérés nécessaires pour nettoyer la colonne et éluer la totalité de PqsB-6His.

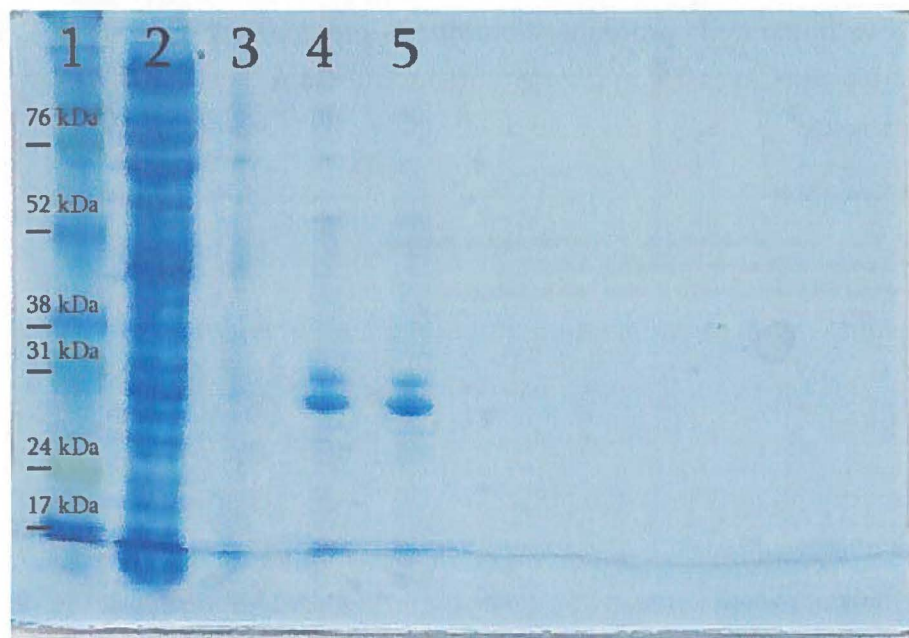


Figure 4.10 Gel de polyacrylamide coloré au Bleu de Coomassie montrant la protéine PqsB-6His élué lors de purification par chromatographie d'affinité. 1 : L'échelle moléculaire protéique Rainbow Full-Range de Biorad, 2 : Contrôle positif (fraction cytoplasmique du lysat de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 1 mM d'IPTG), 3 : Fraction du surnageant (cytoplasme) qui est récolté après un passage dans la colonne de résine de nickel, peu de bandes sont visibles parce que l'échantillon a été mal solubilisé dans le tampon Laemmli 3X, 4 : Première fraction d'éluat (1 volume de colonne de tampon d'éluat à 250 mM d'imidazole et 300 mM de NaCl) après un changement de tampon par méthode de filtre centrifuge de type Amicon, comme décrit dans la section matériel et méthodes, 5 : Seconde fraction d'éluat après un changement de tampon par méthode de filtre centrifuge de type Amicon, comme décrit dans la section matériel et méthodes

4.5 Purification et analyse de PqsB-6His

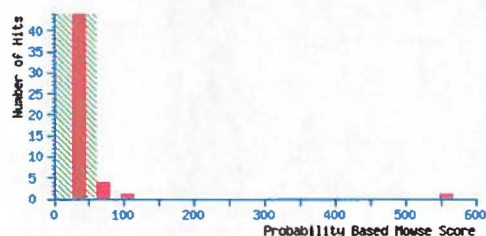
La bande observée sur gel de polyacrylamide ne semble pas avoir le poids moléculaire qui était prédit pour la protéine PqsB-6His. Cette bande apparaît aux environs de 26 kDa tandis que la protéine prédite devrait avoir un poids moléculaire de 31 kDa. Par contre cette bande est de loin la protéine la plus abondante qui a été retrouvée dans l'éluât (voir Figure 4.10). De plus, celle-ci réagit avec les anticorps spécifiques aux étiquettes d'hexahistidine.

Cette bande a donc été découpée dans le but d'un séquençage par CL/SM/SM suite à une digestion à la trypsine. Les résultats de cette analyse donnent un Mowse score de 555 pour PqsB chez PA14 (voir Figure 4.11) ce qui indique une très haute probabilité que la séquence appartienne à la protéine PqsB. Ce résultat correspond aussi à une couverture de 45% de la séquence en acides aminés de PqsB (voir Figure 4.12). De plus, cette couverture inclut la

séquence en N-terminal de la protéine et puisque la présence du segment en C-terminal est confirmée par les tests avec les anticorps anti-hexahistidine, cela indique que la protéine complète est présente.

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 59 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

1. [gi115596194](#) Mass: 30482 Score: 557 Queries matched: 14
beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase-like protein [Pseudomonas aeruginosa PA01]
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
✓ 186	589.43	1176.85	1177.52	-0.67	0	69	0.0049	1	AQGDEMIMQR
✓ 210	695.81	1389.61	1389.71	-0.10	0	71	0.0031	1	CLGPFELASQLR + Carbamidomethyl (C)
✓ 213	708.31	1414.61	1414.74	-0.13	0	74	0.0016	1	LAQDFPQLNWVR
✓ 218	715.78	1429.55	1430.72	-1.16	0	(46)	1	1	ARVFDLTDSSLAR
✓ 220	716.30	1430.59	1430.72	-0.12	0	(34)	15	1	ARVFDLTDSSLAR
✓ 221	716.32	1430.62	1430.72	-0.10	0	66	0.0096	1	ARVFDLTDSSLAR
✓ 222	716.33	1430.65	1430.72	-0.07	0	(55)	0.12	1	ARVFDLTDSSLAR
✓ 223	478.26	1431.76	1430.72	1.04	0	(41)	2.7	1	ARVFDLTDSSLAR
✓ 242	557.34	1668.99	1667.91	1.08	0	66	0.0084	1	GHNLPAQPGLEAVR
✓ 243	835.87	1669.72	1669.83	-0.11	0	(97)	6.8e-006	1	ALYVVDTLASDQGYR
✓ 244	835.89	1669.77	1669.83	-0.06	0	104	1.2e-006	1	ALYVVDTLASDQGYR
✓ 245	557.97	1670.90	1669.83	1.07	0	(67)	0.0072	1	ALYVVDTLASDQGYR
✓ 267	1217.39	2432.77	2432.27	0.50	0	66	0.0053	1	QALGGDPAQEWLPLSIPLNTDIR
✓ 272	975.10	2922.27	2921.53	0.74	0	43	0.78	1	MLIQAVGVNLPSPYVCLEGLQGERFR + Carbamidomethyl (C)

Proteins matching the same set of peptides:

[gi149083318](#) Mass: 30539 Score: 557 Queries matched: 14
PA0997 [synthetic construct]
[gi1116048925](#) Mass: 30496 Score: 555 Queries matched: 14
PqsB [Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14]

Figure 4.11 Résultat de séquençage après digestion tryptique de la bande obtenue sur gel de polyacrylamide correspondant à la protéine PqsB-6His

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 45%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **MLIQAVGVNL PPSYVCLEGP LGGERPRAQG DEMLMQRLLP** AVREALDEAA
51 VKPEEIDLIV GLALSPDHLI ENRDIMAPKI GHPLQKILGA NRA**HVFDLTD**
101 **SSLARALYVV DTLASDQGYR** NVLVVRGESS QGLEVDSESG FALADGALAL
151 LCRPTGKAAP RR**GALGGDPA QEWLPLSIPL NTDIRQVGDV KGHNLNPAQP**
201 **GLPEAVR**AGF TRLAGD**FPQL** NWVREEWFGQ GRPDGR**CLGP FELASQLRAA**
251 QRDRLDELLL ISFDPFGMVV EGVTTLELAGE AHA

Figure 4.12 Peptides tryptiques observés lors du séquençage de PqsB-6His

L'étape suivante aurait dû être l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine non digérée. Ceci nous aurait permis d'obtenir la masse totale de la protéine et de comparer cette masse réelle avec la masse prédite à partir de sa séquence d'acide aminé. Ceci se fait normalement en infusion directe, en injectant l'éluat issu de la purification. Mais puisque la présence d'imidazole dans la solution pourrait interférer avec l'ionisation de la protéine, un changement de tampon doit être effectué auparavant. Le changement de tampon a été tenté en passant l'éluat dans un filtre Amicon laissant passer les molécules plus petites que 3 kDa. Le filtre retient donc PqsB-6His en laissant écouler le tampon d'élution. La protéine a donc été ensuite resuspendue dans de l'eau et des tests ont été effectués sur le spectromètre de masse en conditions acides par la suite. Le spectre de masse obtenu présente plusieurs pics correspondant aux divers états de charges de la protéine. Après déconvolution, nous avons obtenu une masse de 31824 Daltons (voir Figure 4.13), ce qui est très proche de la masse prédite de la protéine avec ses 6 résidus additionnels d'histidine (soit 31816 Daltons). Par la suite, les échantillons de protéines purifiées ont été entreposés à -20°C dans de l'eau après changement du tampon imidazole par concentration sur filtre Amicon.

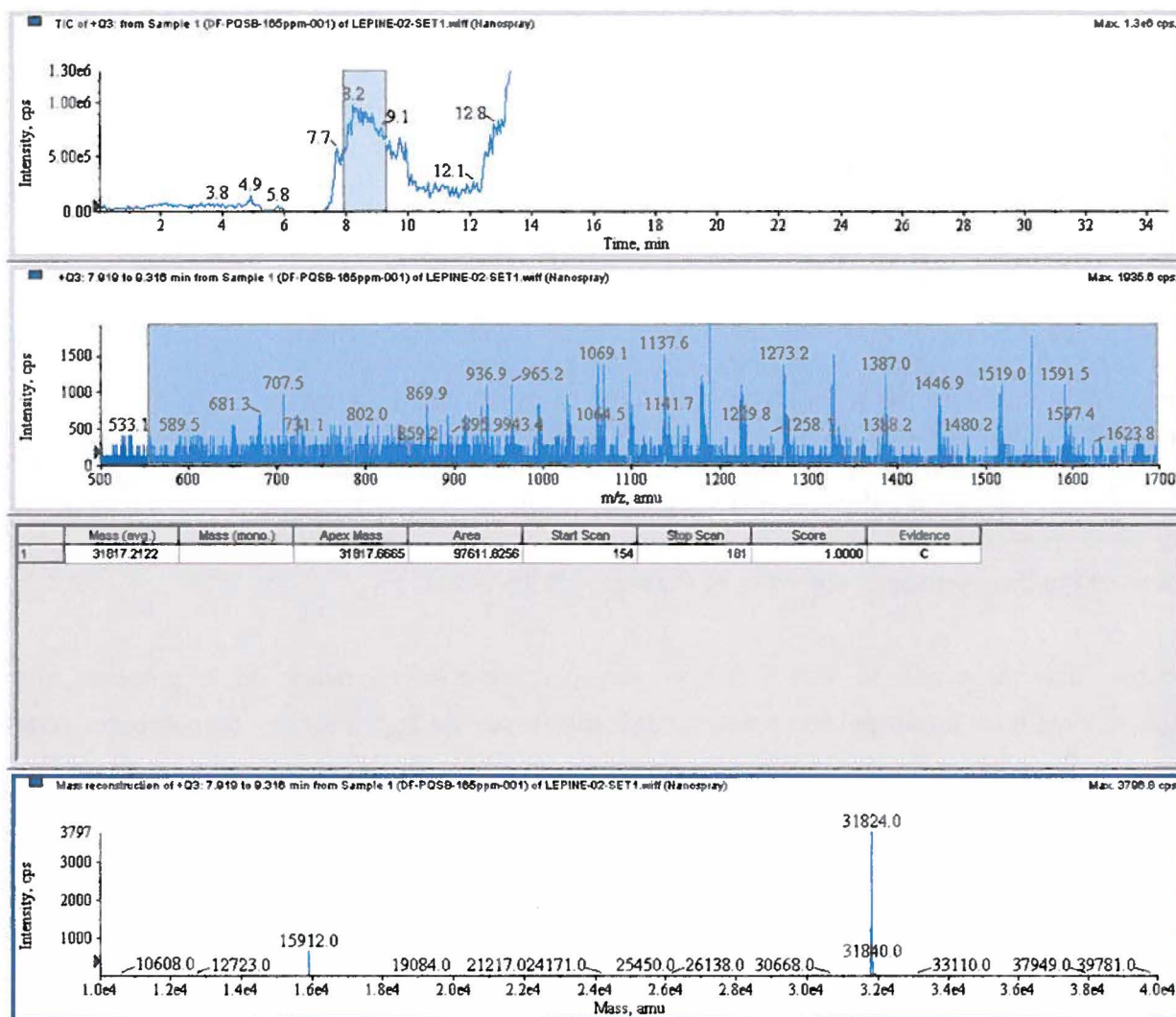


Figure 4.13 Résultat de l'analyse par SM de la protéine PqsB-6His complète.

4.5.1 La non reproductibilité des expériences avec PqsB-6His

Par la suite, d'autres analyses de spectrométrie de masse ont été tentées sur la protéine PqsB-6His après décongélation, mais tous les échantillons injectés n'ont présenté aucun signal. Bien que la présence de PqsB-6His puisse être confirmée sur gel de polyacrylamide dans ces échantillons après la purification et aussi après le changement de tampon par la suite, aucune protéine n'a pu être détectée en SM dans les échantillons décongelés. Comme un précipité blanc a été observé lors de la décongélation des échantillons, il est possible que la protéine se soit dégradée et ne soit effectivement plus soluble dans les échantillons conservés à -20°C . Pour vérifier cette éventualité, les échantillons ont été décongelés et vérifiés par

électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une fois le gel coloré au bleu de Coomassie, celui-ci révèle qu'il n'y a pas de protéine dans l'échantillon décongelé.

Il semblerait donc que la source du problème est le fait d'avoir conservé les échantillons dans l'eau lors de la congélation. PqsB-6His est soluble dans l'eau à température ambiante, mais semble précipiter à basse température, lors de l'entreposage à -20°C. Une fois précipitées, les protéines ne semblent pas se resolubiliser dans l'eau. Un tampon de conservation pour protéine à base d'HEPES, d'EDTA et de glycérol a été utilisé pour entreposer les protéines par congélation après le changement de tampon. Ce type de tampon est utilisé pour l'entreposage d'échantillons de protéines à -80°C. De plus, les échantillons ont par la suite été aliquotés de façon à décongeler seulement une fois chaque aliquot, ce qui minimise le risque d'endommager la protéine par de multiples congélations.

4.5.2 PqsB-6His devient insoluble.

Après cet incident, la protéine PqsB-6His n'a plus été retrouvée dans la fraction cytoplasmique de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 après induction à l'IPTG.

Pour vérifier si ce problème provient d'un manque d'expression du gène *pqsB-6His*, une expérience a été faite avec le lysat total de la bactérie. Comme auparavant, après induction à l'IPTG, les cellules ont été centrifugées et lysées. Les corps d'inclusion ont été séparés du cytoplasme par une étape de centrifugation et les deux fractions ont été analysées par immunobuvardage de type Western. La révélation de la membrane indique que la protéine est toujours présente dans la bactérie, sauf que cette fois elle n'est retrouvée que dans les corps d'inclusion (voir Figure 4.14). Des conditions d'incubation différentes ont donc été explorées pour tenter de minimiser le stress sur la cellule, ce qui devrait encourager la production de PqsB dans la fraction cytoplasmique sous forme soluble.

Nous avons donc testé l'induction à 15°C conformément à l'article de Yi *et al.* 2009 qui traite de l'expression de protéines de fusion chez *E. coli* BL21 (DE3) à différentes températures. À cette température, la croissance et la production de protéines sont grandement ralenties ce qui pourrait ralentir la production de la protéine recombinante et causer moins de stress à la bactérie. Un autre paramètre à considérer est la concentration d'IPTG ajouté. Comme 1 mM est une quantité importante, l'activation soudaine des promoteurs du gène *pqsB-6His* situé sur les plasmides pourrait aussi être un facteur causant l'accumulation de la protéine

recombinante dans les corps d'inclusion. Des concentrations variant entre 0.1 et 1 mM ont été testées pour vérifier si l'expression du gène *pqsB-6His* se fait encore à plus basse concentration et aussi pour vérifier si cela induit la synthèse d'une protéine soluble et bien repliée.

Les conditions d'induction plus douces n'ont pas amené de changement dans la solubilité de la protéine qui n'a été retrouvée que dans les corps d'inclusion. Par contre, même à une concentration aussi basse que 0.15 mM d'IPTG, la quantité de protéine produite est restée importante. Une concentration d'IPTG de 0.25 mM serait donc probablement suffisante pour produire de bonnes quantités de cette protéine tout en minimisant le stress causé aux cellules, cette concentration a été utilisée dans les expériences subséquentes.

Une autre hypothèse serait que le plasmide aurait acquis une ou des mutations causant le mauvais repliement de la protéine PqsB-6His. Pour vérifier si une délétion importante est apparue dans le gène *pqsB-6His*, une PCR a été faite sur le plasmide pMSR1 extrait de *E. coli* BL21 (DE3) pMSR1 avec les mêmes amorces utilisées lors des clonages pour les tests de complémentations. La PCR révèle que l'insert présent dans le plasmide a conservé sa taille, ce qui élimine la possibilité d'une importante délétion.

Le plasmide a ensuite été séquencé. Les séquences obtenues ont été vérifiées par alignement à la séquence disponible sur www.pseudomonas.com. Les résultats n'ont montré aucune mutation, de plus la séquence de l'étiquette d'hexahistidine a été observée (voir Figure 4.15).

Par contre, le stress occasionné par la surexpression de protéine peut affecter la stabilité des plasmides dans des souches telles que *E. coli* BL21 (DE3) (Bentley *et al.* 1990). C'est pourquoi, nous avons donc décidé d'extraire de nouveau le plasmide pMSR1 à partir de la souche *E. coli* DH5 α et de transformer le plasmide dans *E. coli* BL21(DE3) à chaque fois qu'une purification devait être effectuée. Ceci devrait minimiser les probabilités de voir apparaître des mutations sur le plasmide qui pourrait causer l'agrégation de la protéine.

Le plasmide a été transformé de nouveau par choc thermique, les colonies sélectionnées ont été mises en culture et vérifiées par extraction plasmidique avant de procéder à la purification. La présence de pMSR1 a été confirmée, les cellules ont été induites avec 0.25mM d'IPTG à 15°C, les cellules centrifugées et congelées pour purification subséquente. La purification sur colonne de nickel a ensuite été faite telle que décrite précédemment.

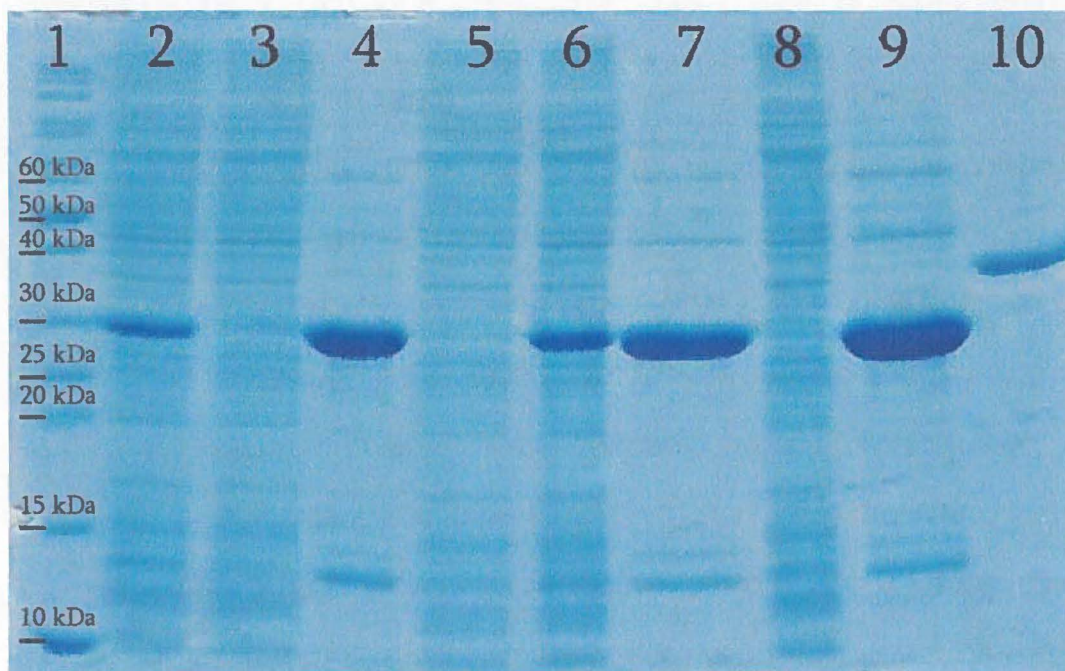


Figure 4.14 PqsB-6His est insoluble après induction à plusieurs concentrations d'IPTG. 1 : Échelle moléculaire EZ Run Rec Prestained protein ladder de Fisher BioReagents, 2 : lysat total de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,1 mM d'IPTG (15°C O/N), 3 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,1 mM d'IPTG (15°C O/N), 4 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,1 mM d'IPTG (15°C O/N), 5 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,2 mM d'IPTG (15°C O/N), 6 : lysat total de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,2 mM d'IPTG (15°C O/N), 7 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,5 mM d'IPTG (15°C O/N), 8 : surnageant (cytoplasme) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,23 mM d'IPTG (15°C O/N), 9 : culot (corps d'inclusion) de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1 induit avec 0,5 mM d'IPTG (15°C O/N), 10 : contrôle positif (aliquot de PqsD-6His purifié, 36 kDa)


```

1 ATGTTGATTG AGGCTGTGGG GGTGAACCTG CCCCCATCCT ATGTGTGTCT
51 GGAGGGGGCCG CTGGGAGGCG AACGCCCTCG CGCCCAGGGC GACGAGATGC
101 TGATGCAGCG CTTGCTGCCG GCGGTTGCGG AAGCCCTGGA CGAGGCGGCG
151 GTCAAGCCCG AGGAGATCGA CCTGATCGTC GGCCTCGCCC TGTCTCCCGA
201 CCATCTGATC GAGAACCGCG ACATCATGGC GCCGAAGATC GGCCATCCGT
251 TGCAGAAGAT CCTCGGCGCG AATCGCGCCC ATGTCTTCGA CCTCACCGAC
301 TCGAGCCTGG CTCGCGCCCT CTACGTGGTC GATACCCTCG CCAGCGACCA
351 GGGCTATCGC AACGTCCTGG TCGTGCGCGG CGAATCCAGC CAGGGATTGG
401 AAGTGGACAG CGAGTCTGGC TTCGCCCTTG CCGACGGCGC CCTGGCGCTG
451 CTCTGCCGGC CGACCGGCAA GGCCGCGTTC CGTCGCGGTG CGCTGGGCGG
501 TGATCCGGCG CAGGAATGGC TGCCGCTGAG CATTCCGCTG AATACCGATA
551 TTCGCCAGGT AGGCGACGTC AAGGGACACC TCAACCTGCC GGCCCAACCT
601 GGATTGCCCC AAGCGGTACG CGCCGGATTC ACCCGTTTGG CCGGGGACTT
651 CCCGCAACTG AACTGGGTGC GCGAGGAATG GTTCGGCCAG GGACGGCCCCG
701 ATGGTCGTTG CCTGGGGCCG TTCGAACTGG CGTCGCAACT GCGCGCGGCC
751 CAGCGCGACC GTCTGGATGA ACTGCTGCTG ATCAGCTTCG ATCCGTTTCG
801 CATGGTGGTG GAGGGCGTGA CCCTGGAACCT GGCGGGAGAA GTCATGCA
851 TGCATCTCGA GCACCACCAC CACCACCACT GA

```

Figure 4.15 Séquence de PqsB-6His. Adapté de la séquence de PqsB PA14 disponible sur www.pseudomonas.com. La partie en turquoise code pour l'étiquette d'hexahistidine (en bleu foncé est le nouveau codon-stop, le codon-stop original étant remplacé par le codon CTG). En mauve est le codon d'initiation de la traduction. La séquence du gène avec l'étiquette d'hexahistidine a été obtenue par séquençage.

Après purification de la fraction cytoplasmique de *E. coli* BL21(DE3) pMSR1, le gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie a montré des bandes correspondant à 26 kDa dans l'éluât. Ces bandes correspondent à celles apparaissant sur l'immunobuvardage de type Western effectué avec les anticorps spécifiques aux étiquettes d'hexahistidine. Il semble donc que dans ces conditions, la protéine PqsB-6His, se retrouve de nouveau dans la fraction cytoplasmique soluble. Pour confirmer ce point hors de tout doute, les bandes du gel de polyacrylamide ont été découpées et le séquençage par SM-SM a confirmé que cette protéine était PqsB-6His.

Cette nouvelle transformation a donc permis de retrouver une protéine soluble, mais la quantité de protéine purifiée dans ces conditions n'est qu'une petite fraction de celle qui était produite auparavant, ce qui est vraisemblablement dû aux nouvelles conditions d'induction. Pour vérifier cette hypothèse, une purification a été effectuée avec des cellules de *E. coli* BL21(DE3) issues d'une nouvelle transformation de pMSR1 induites à 25 °C avec une concentration de 1 mM d'IPTG, soit les conditions initiales d'induction. La présence du plasmide dans ces cellules a été confirmée par extraction plasmidique.

Après passage de la fraction cytoplasmique sur colonne de nickel, le gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie n'a présenté aucune bande dans les puits correspondant à l'éluât. De même, aucune bande n'a été révélée sur la membrane de PVDF utilisée pour l'immunobuvardage de type Western. La protéine, si exprimée, n'était donc pas soluble dans ces conditions.

Par manque de temps, les travaux sur PqsB-6His ont été arrêtés.

4.6 L'acide dodécanoïque deutéré

4.6.1 L'effet de l'acide dodécanoïque sur le QS de *Pseudomonas aeruginosa*

Afin de vérifier notre hypothèse que l'acide dodécanoïque puisse être un précurseur des HAQ, nous avons reproduit dans un premier temps l'expérience de Kwan et collaborateurs et nous avons vérifié l'effet d'un ajout d'acide dodécanoïque sur l'expression des facteurs de virulence et sur les quantités de molécules de signalisation synthétisées par la bactérie. Pour se faire, 1 mM d'acide dodécanoïque a été ajouté aux cultures, soit la même quantité que celle

utilisée par Kwan et collaborateurs. La concentration de pyocyanine a été suivie par spectrophotométrie à 520 nm après extraction au dichlorométhane (Mamoru, 1958). Les résultats montrent que la concentration de pyocyanine est augmentée par l'acide dodécanoïque, comme rapporté précédemment. Pour ce qui est des molécules de signalisation comme le 3-oxo-C₁₂ HSL, le C₄ HSL et les HAQ, les échantillons ont été extraits à l'acétate d'éthyle et analysés par CL/SM. Aucune augmentation de la concentration de C₄ HSL n'a été observée et le 3-oxo-C₁₂ HSL n'a montré qu'une faible augmentation par rapport au témoin (voir Figure 4.16). La quantification des HAQ, quant à elle, montre une augmentation importante de la concentration du HHQ produit, ainsi qu'une augmentation significative de la synthèse de PQS et de HQNO (voir Figure 4.17)

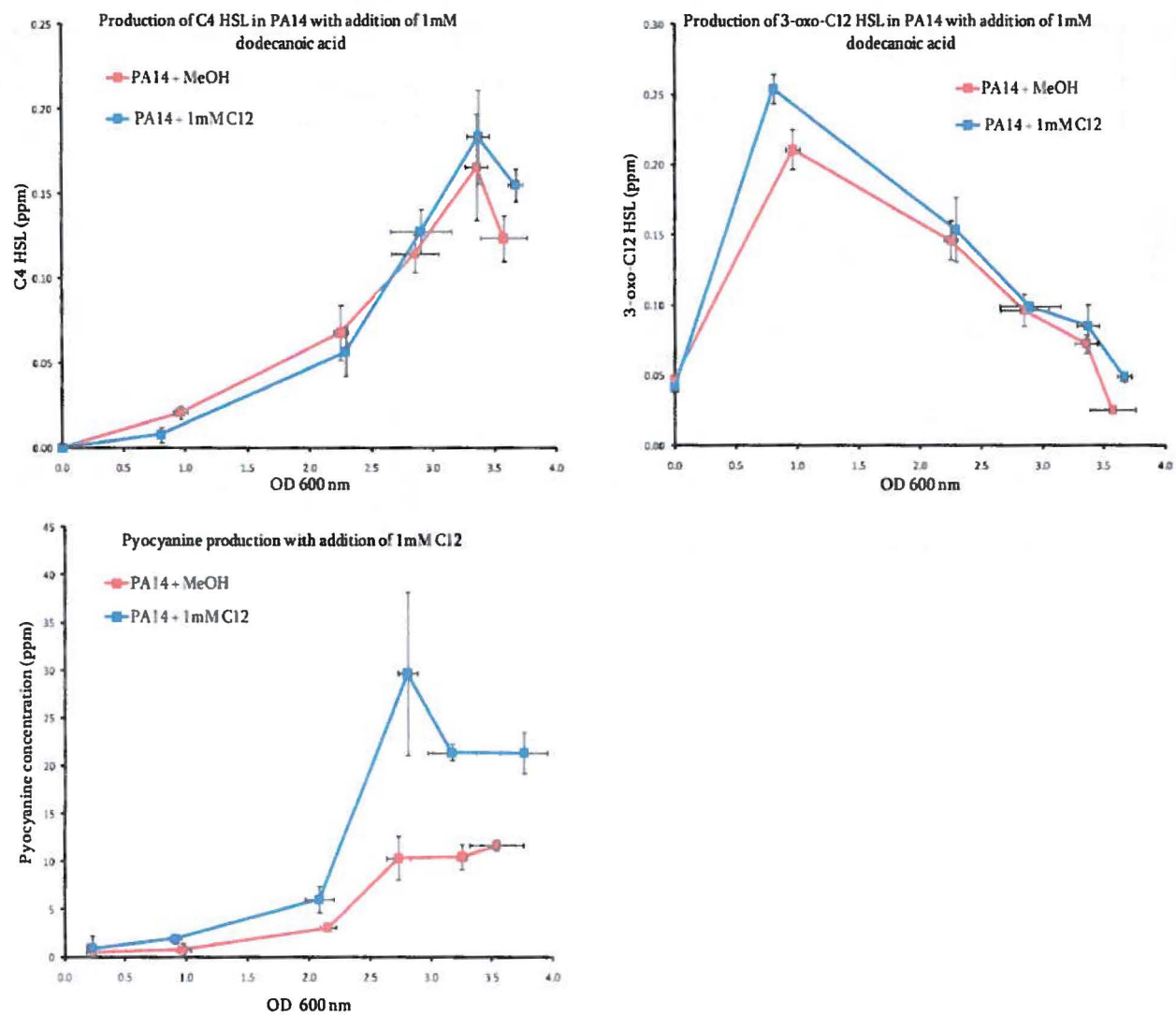


Figure 4.16 Cinétique de la production des AHL par *P. aeruginosa* PA14 en présence ou non de 1 mM d'acide dodécanoïque

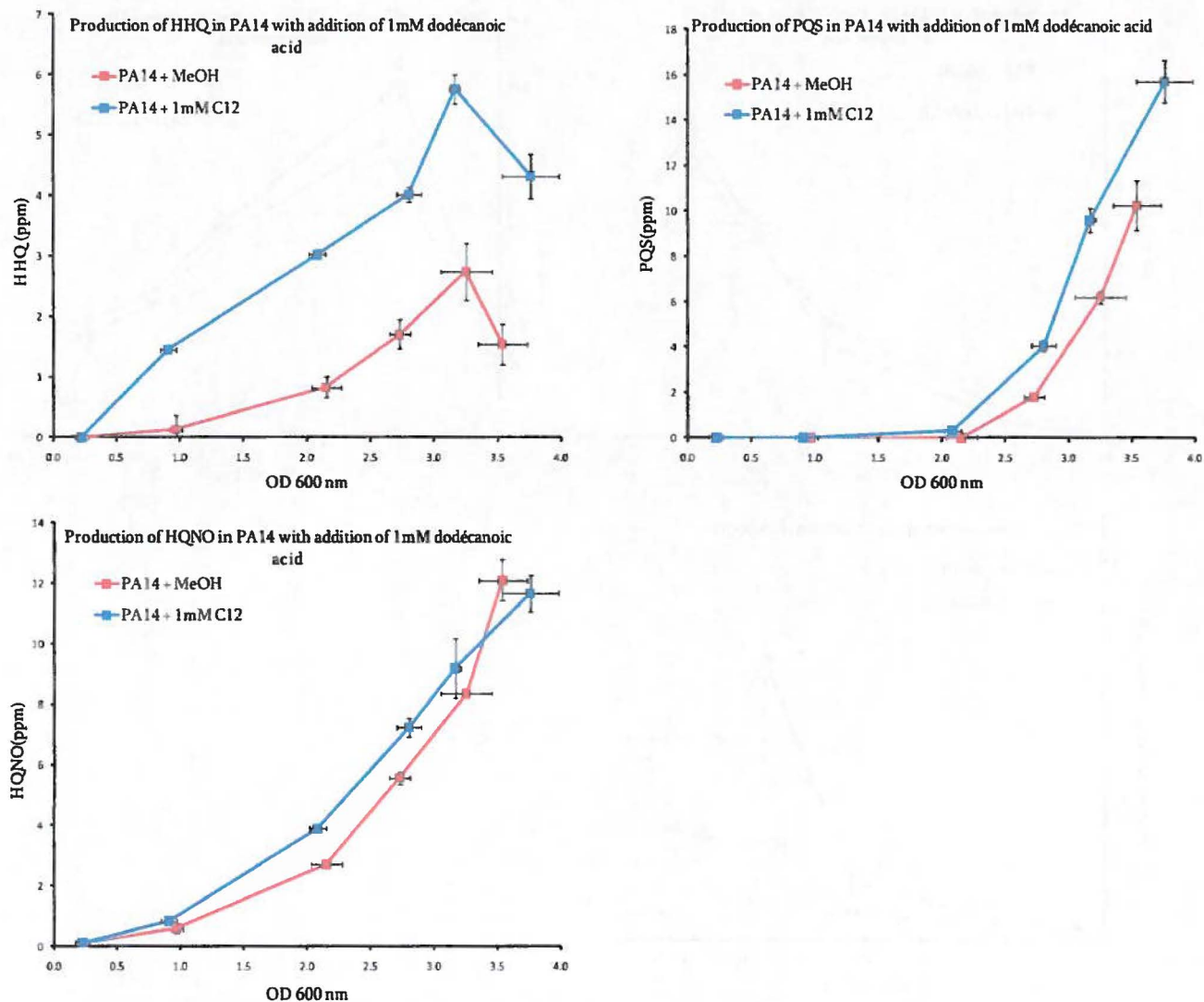


Figure 4.17 Cinétique de la production de HAQ par *P. aeruginosa* PA14 en présence ou non de 1 mM d'acide dodécanoïque

4.6.2 L'acide dodécanoïque deutéré

Afin d'étudier son incorporation dans les HSL et les HAQ, de l'acide dodécanoïque complètement marqué avec du deutérium a été ajouté aux cultures de *P. aeruginosa* PA14. La même concentration d'acide dodécanoïque marqué tel que décrit dans l'expérience précédente a été ajoutée, soit 1 mM. Une fois l'acide deutéré ajouté, la cinétique des cultures ont été suivies et les molécules de signalisation ont été extraites de la même façon que le test précédent en vue de l'analyse par CL/SM.

Les cultures où l'acide dodécanoïque deutéré a été ajouté ont présenté des retards de croissance. Les densités optiques mesurées pour ces cultures étaient significativement plus basses que celles prises pour les contrôles, soit des cultures de *P. aeruginosa* PA14 auxquelles ont été ajoutés 1 mM d'acide dodécanoïque non marqué tel que présenté dans le tableau 4.1. Les données de ce tableau sont issues d'une cinétique de croissance avec *P. aeruginosa* PA14, les mesures ayant été prises en triplicata.

Tableau 4.1 Retard de croissance causé par l'ajout d'acide dodécanoïque deutéré à des cultures de *P. aeruginosa*

Heures de croissance	Culture de PA14 + 1 mM d'acide dodécanoïque	-	Culture de PA14 + 1 mM d'acide dodécanoïque deutéré	-
-	DO ₆₀₀	Écart-type	DO ₆₀₀	Écart-type
1h30	0.00	0.00	0.00	0.00
3h00	0.84	0.07	0.10	0.06
4h30	2.10	0.09	0.31	0.03
10h00	3.77	0.13	2.86	0.30
24h00	1.89	0.05	2.48	0.05

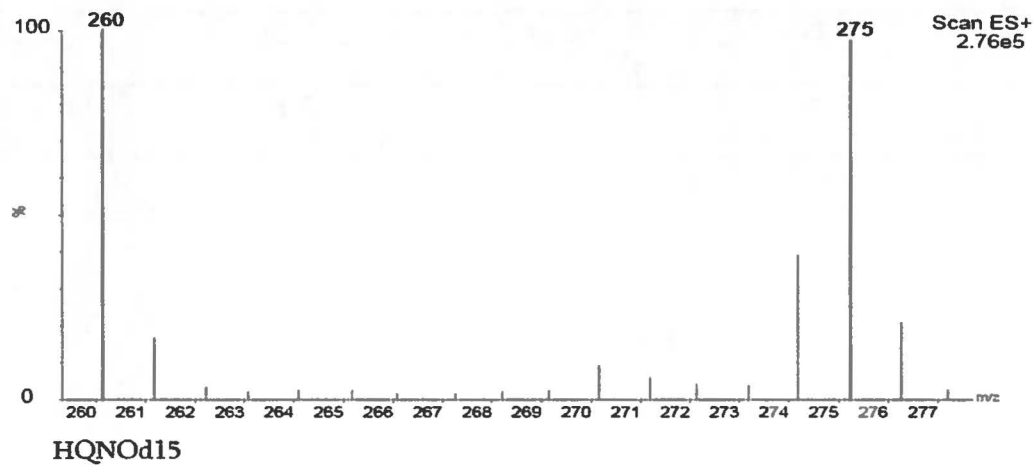
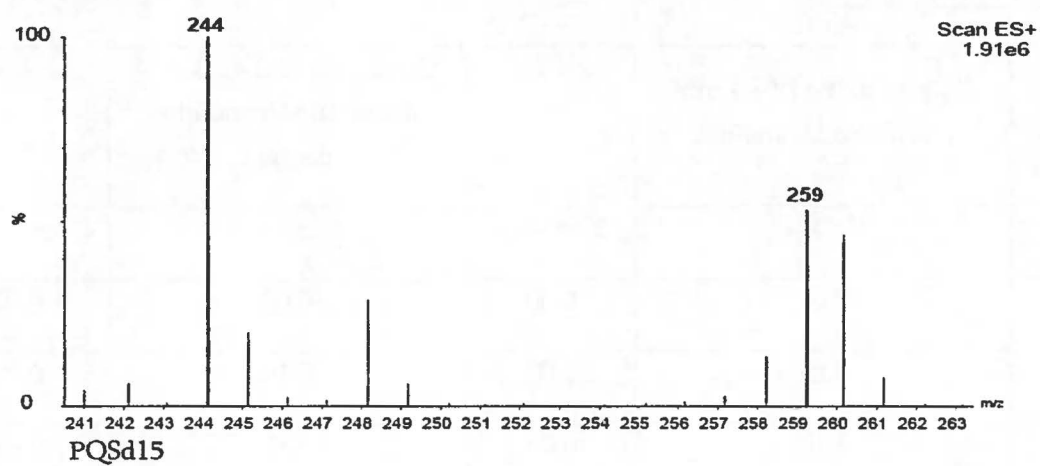
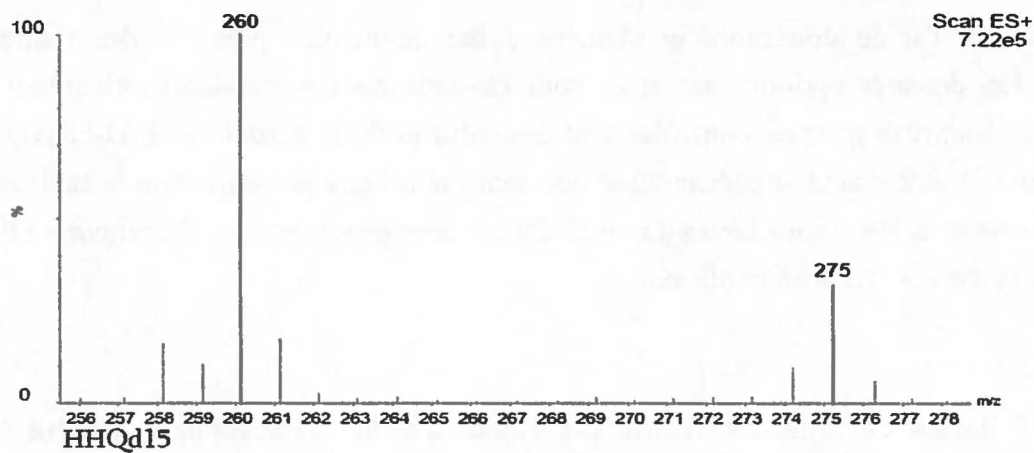


Figure 4.18 Spectres des HAQ en C₇ marqués et non marqués produits par *P. aeruginosa* PA14 en présence de 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré et 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré

Tableau 4.2 L'effet de différentes concentrations d'acide dodécanoïque et d'acide dodécanoïque deutéré sur la croissance de *P. aeruginosa* PA14.

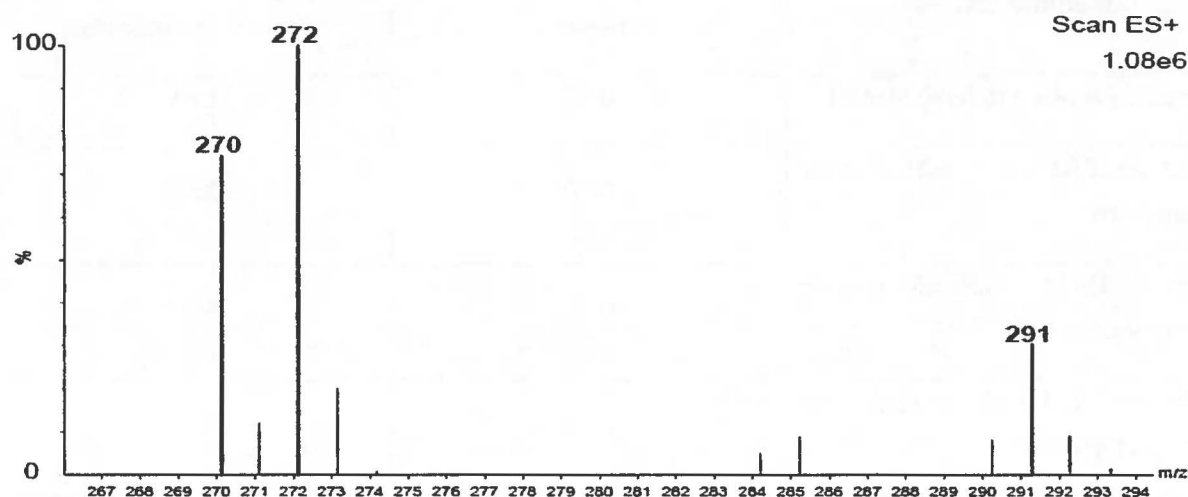
Conditions testées	DO ₆₀₀ après 3 heures de croissance	DO ₆₀₀ après 4 heures 30 minutes de croissance
Culture de PA14 + 1% (v/v) MeOH	0.37	1.61
Culture de PA14 + 1 mM d'acide dodécanoïque	0.20	0.85
Culture de PA14 + 0.5 mM d'acide dodécanoïque	0.22	1.23
Culture de PA14 + 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré	0.10	0.28
Culture de PA14 + 0.5 mM d'acide dodécanoïque et 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré	0.22	0.92

Afin de vérifier si l'acide dodécanoïque marqué contenait une substance toxique, un aliquot de la solution a été injecté dans le spectromètre de masse, mais aucune autre substance n'a été observée.

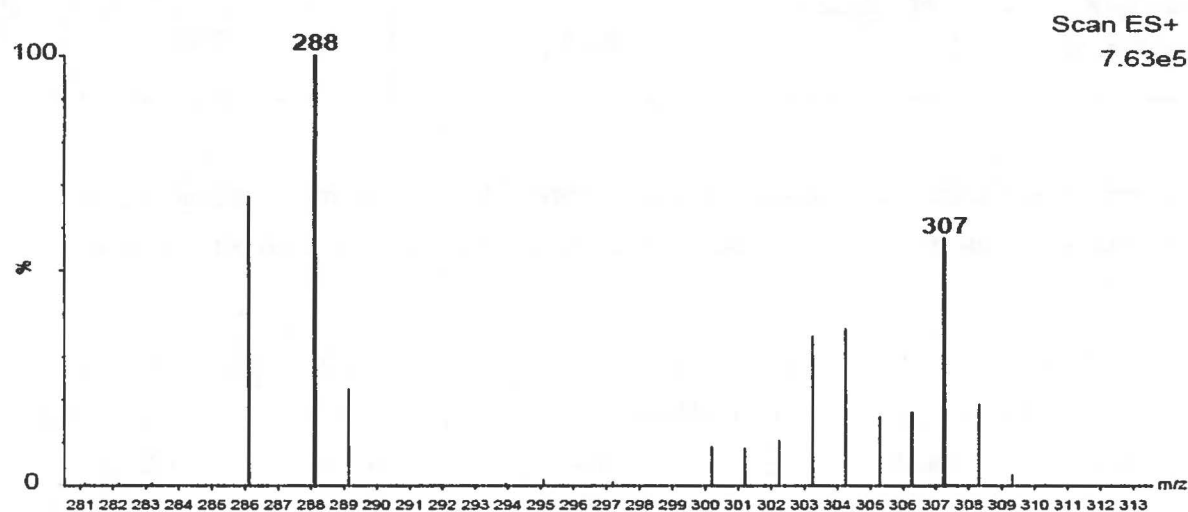
Afin de compenser pour une possible toxicité due à la présence d'un grand nombre de deutériums sur l'acide gras, l'acide dodécanoïque deutéré a été dilué avec de l'acide dodécanoïque non deutéré pour obtenir un mélange équimolaire de 0,5 mM d'acide dodécanoïque et 0,5 mM d'acide dodécanoïque deutéré pour en arriver à la concentration finale précédente de 1 mM. Après ajout de ce mélange aux cultures de *P. aeruginosa* PA14, aucun retard de croissance n'a été observé par rapport à une même concentration d'acide non deutéré (voir résultats Tableau 4.2), et des échantillons ont été analysés au SM. Les résultats dans ce tableau sont issus de mesures prises en unicata.

Aucune HSL marquée n'a été observée, ni le C₄ HSL ni le 3-oxo-C₁₂ HSL. Par contre, une différence de masse de +15 Daltons a été observée pour les HAQ ayant une chaîne aliphatique en C₇ (HHQd15, PQSD15 et HQNOD15) (voir Figure 4.18). Des HAQ en C₉ ont aussi été observés lors de ces expériences. Ceux-ci présentaient une différence de masse de +19 Daltons avec les HAQ en C₉ non marqués (voir Figure 4.19). Seulement du HNQ (4-

hydroxy-2-nonylquinoline) et du HQNO en C₉ ont été observés, il n'y avait pas de PQS en C₉. De plus, l'ion 270 présent dans cette figure correspond au HQNO insaturé normalement présent dans ces conditions.



HNQd19



HQNO(C9)d19

Figure 4.19 Spectres des HNQ et du HQNO en C₉ marqués et non marqués produits par *P. aeruginosa* PA14 en présence de 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré et 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré.

Une autre expérience avec l'acide dodécanoïque deutéré a été tentée pour déterminer à quelle étape de la synthèse des HAQ se produit l'ajout de la chaîne aliphatique. Il a été établi précédemment (résultats non publiés de Valérie Dekimpe, Institut Armand-Frappier, laboratoire du professeur Éric Déziel) que la biosynthèse des HAQ peut être divisée en 2 étapes : la première étape nécessitant les protéines PqsA et PqsD et qui mène à la production

dans le surnageant de culture d'un précurseur stable et une deuxième étape requérant les protéines PqsB et PqsC. Pour déterminer à laquelle de ces étapes la chaîne aliphatique est ajoutée, de l'acide dodécanoïque marqué a été ajouté séparément à chacune des étapes de synthèse et les résultats analysés pour le marquage des HAQ produits. Dans une première expérience, l'acide dodécanoïque marqué a donc été ajouté aux mutants *pqsB*⁻ polaire (mais "leaky") et *pqsC*⁻ non polaire lesquels possèdent les gènes *pqsA* et *pqsD* fonctionnels et qui peuvent donc effectuer la première étape de la synthèse. Le surnageant de ces cultures a ensuite été séparé des cellules par centrifugation et ensuite extrait à l'acétate d'éthyle afin d'éliminer l'acide dodécanoïque résiduel dans le surnageant de culture. La fraction aqueuse de l'extraction a été ensuite donnée au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ de la souche PA14. Une seconde expérience a été effectuée en parallèle de la même façon, sauf qu'aucun acide dodécanoïque marqué n'a été ajouté aux cultures des mutants *pqsB*⁻ et *pqsC*⁻, l'acide marqué ayant été ajouté au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻. Les cultures ont ensuite été analysées par CL/SM pour la présence de HAQ marqués au deutérium.

Les résultats de l'analyse par CL/MS montrent qu'il n'y a pas de HAQ marqués dans les échantillons de la première expérience (voir Figure 4.20), mais que les HAQ issus de la deuxième expérience présentent un marquage important (voir Figure 4.21).

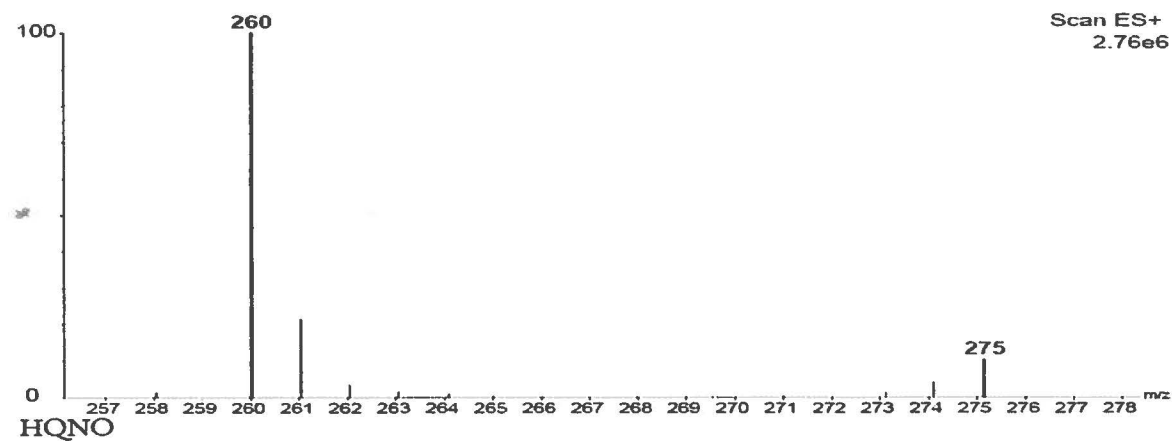
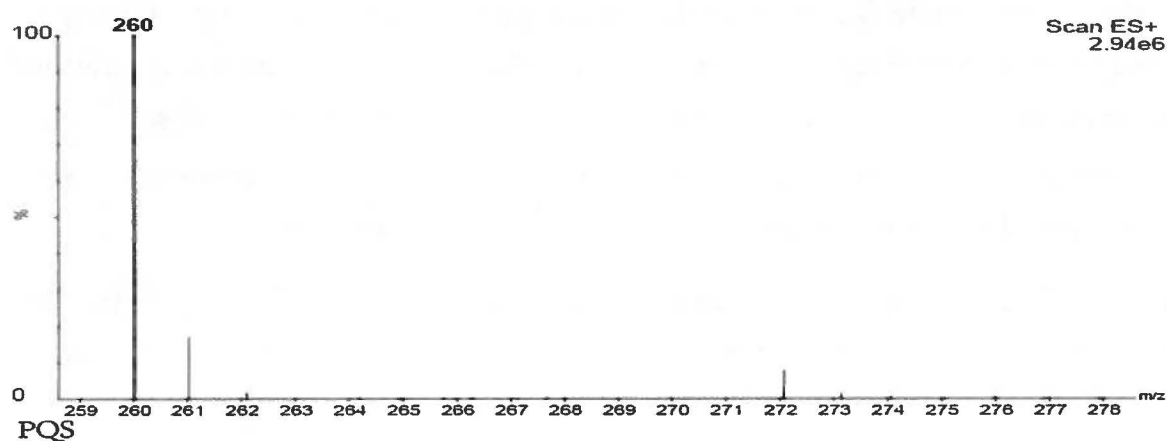
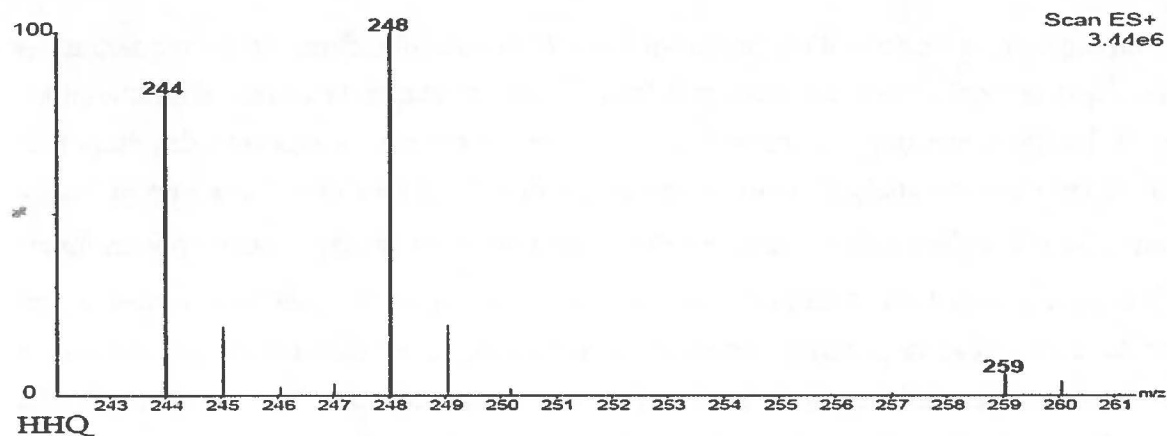


Figure 4.20 Résultats de la première expérience de marquage en 2 étapes. Dans cette expérience l'acide dodécanoïque deutéré a été ajouté à une culture du mutant *pqsB* polaire (leaky), le surnageant extrait à l'acétate d'éthyle et donné au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻. Une faible proportion des HHQ produits étaient marquées. Ceci est expliqué par une mauvaise extraction, ce qui a pour effet de laisser des traces d'acide dodécanoïque deutéré dans le surnageant de la première culture. L'ions à m/z 248 dans le spectre du HHQ correspond au standard interne HHQd4

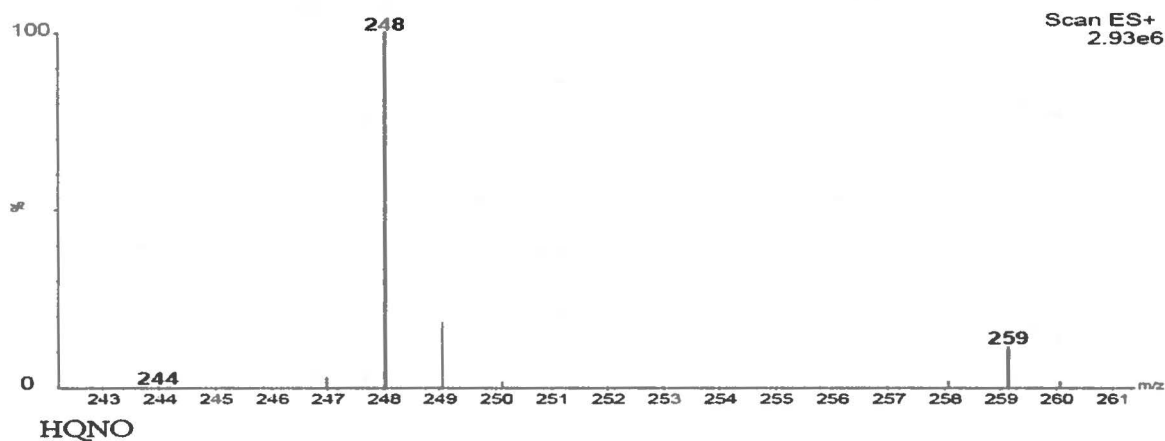
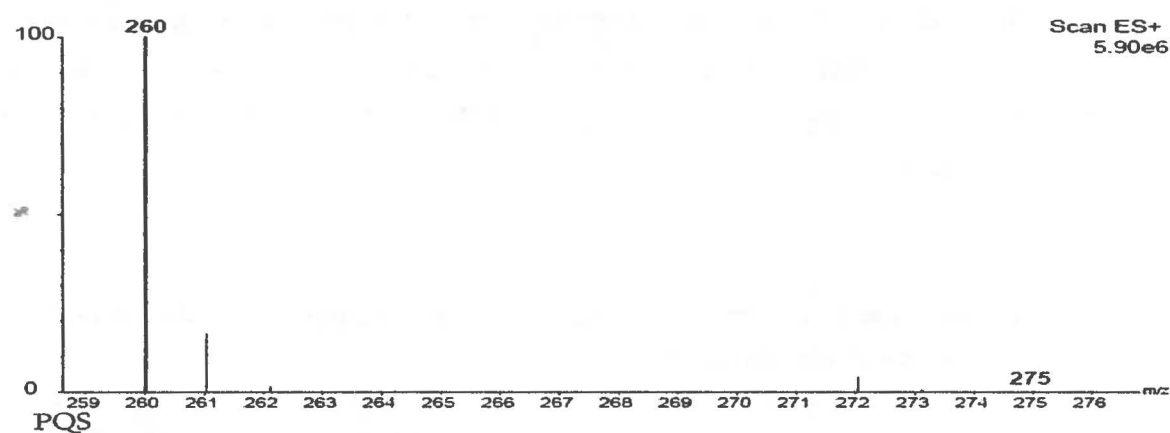
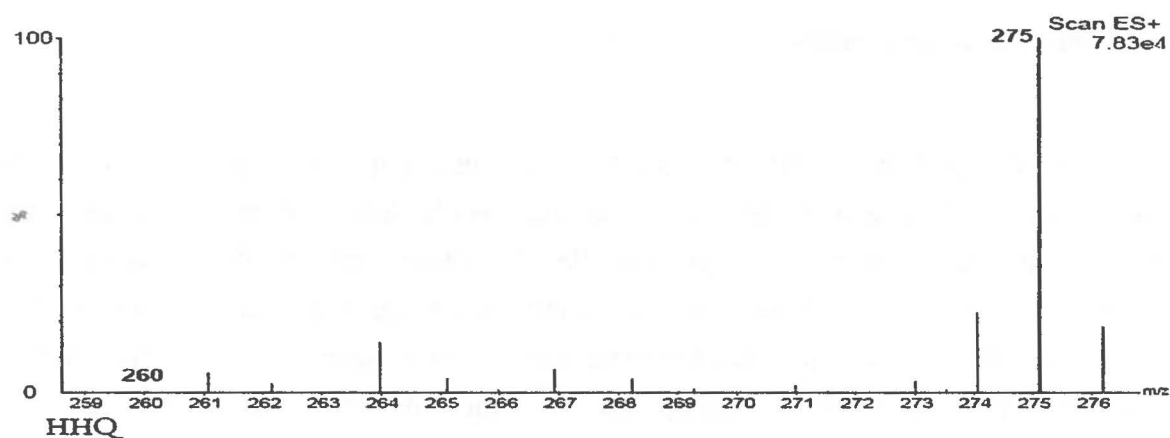


Figure 4.21 Résultats de la deuxième expérience de marquage en 2 étapes. Dans cette expérience l'acide dodécanoïque deutéré a été ajouté à une culture du double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ mutant, le surnageant du *pqsB* polaire (leaky) a été extrait à l'acétate d'éthyle. Dans ce cas une proportion importante des HAQ produits était marquée. Par contre, très peu de HAQ ont été produits puisque l'acide dodécanoïque deutéré a causé des retards de croissances importants. De plus, seulement une culture du triplicata contenait des HAQ puisqu'il n'y a pas eu suffisamment de croissance dans les autres cultures.

4.6.3 L'acide octanoïque deutéré

Afin de vérifier si la portion aliphatique des HAQ en C₇ provient d'un 3-cétoacide issu de la β -oxydation d'un acide gras à longue chaîne comme l'acide dodécanoïque ou s'il provient directement d'un acide gras en C₈ comme l'acide octanoïque, de l'acide octanoïque complètement marqué avec du deutérium a été ajouté à une culture de *P. aeruginosa* PA14. Il s'est avéré que l'acide octanoïque deutéré était aussi toxique pour la bactérie que l'acide dodécanoïque deutéré, comme en témoignent les faibles densités optiques des cultures comparées aux contrôles contenant l'acide octanoïque non deutéré. L'utilisation d'un mélange de 0,5 mM d'acide octanoïque marqué et de 0,5 mM d'acide octanoïque non marqué a permis une croissance acceptable des cultures (voir Tableau 4.3) qui ont ensuite été analysées en CL/SM. Les HAQ obtenus (HHQ, PQS et HQNO) (voir Figure 4.22) ont présenté un important marquage de +15 Daltons

Tableau 4.3 L'effet de différentes concentrations d'acide octanoïque et d'acide octanoïque deutéré sur la croissance de *P. aeruginosa* PA14.

Heures d'incubation	2 heures	4 heures	5 heures 30 minutes	Cultures incubées pendant la nuit
PA14 + 0,5 mM d'acide octanoïque (DO ₆₀₀)	0,31±0,03	2,80±0,19	3,66±0,06	2,01±0,07
PA14 + 1 mM d'acide octanoïque (DO ₆₀₀)	0,23±0,03	2,62±0,22	3,14±0,12	2,04±0,06
PA14 + 0,5 mM d'acide octanoïque deutéré (DO ₆₀₀)	0,16±0,05	1,29±0,91	0,27±0,04	2,28±0,26
PA14 + 0,5 mM d'acide octanoïque et 0,5 mM d'acide octanoïque deutéré (DO ₆₀₀)	0,26±0,02	2,33±0,11	3,14±0,10	2,38±0,34

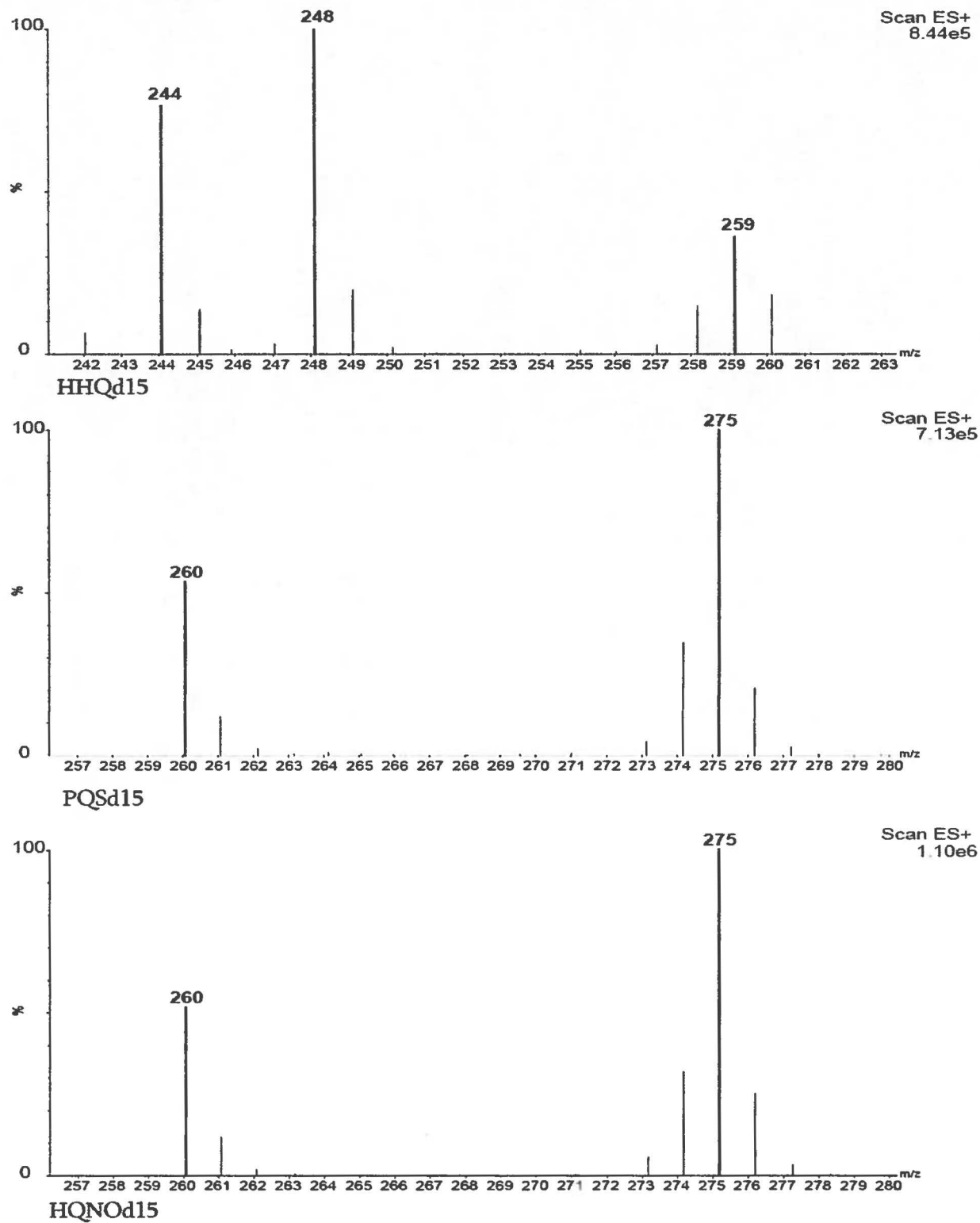


Figure 4.22 Spectres des HAQ marqués et non marqués produits par *P. aeruginosa* PA14 en présence de 0,5 mM d'acide octanoïque + 0,5 mM d'acide octanoïque deutéré

5 DISCUSSION

5.1 Purification de la protéine PqsD-6His

La protéine PqsD-6His a été purifiée selon le même protocole subséquent employé avec PqsC-6His et PqsB-6His. L'activité de la protéine purifiée a été testée *in vitro* dans les conditions décrites par (Zhang *et al.* 2008) pour la synthèse de DHQ lorsque mélangée à du malonyl-CoA et de l'anthranoyl-CoA. Nous avons bien observé la production de DHQ, ce qui confirme que l'enzyme purifiée était bien active. Nous avons aussi recherché l'apparition de 2-AA dans le mélange réactionnel, étant donné que ce composé, qui possède une activité biologique importante, est normalement produit par *P. aeruginosa* et que sa voie de biosynthèse requiert l'acide anthranilique et les enzymes encodées par *pqsA* et *pqsD*. Du 2-AA a été détecté lors de tests *in vitro* lorsque la réaction se déroule à un pH de 7.5. Cependant l'utilisation de conditions plus basiques comme avec des tampons Tris-HCl de pH 8.0 et 8.5, n'ont pas permis d'observer la production de 2-AA. Cette molécule est donc synthétisée par l'enzyme PqsD à partir d'anthranoyl-CoA.

D'autres tests pourront être effectués avec PqsD lorsque les protéines PqsB et PqsC pourront être purifiées et ajoutées au mélange réactionnel. Ceci permettra d'explorer plus spécifiquement les voies de synthèse du HHQ. D'ici à ce que cela soit possible, les travaux sur PqsD sont mis en attente.

5.2 Protéine PqsC-6His

5.2.1 Localisation de la protéine

Lorsque la souche de *E. coli* BL21(DE3) contenant le vecteur pMSR2 est induite avec l'IPTG à 25 °C ou à 37 °C, la protéine PqsC-6His produite est retrouvée dans les corps d'inclusion. Les corps d'inclusion sont des agrégats de protéines non solubles ou précipitées qui s'accumulent dans la cellule. Ceci est souvent observé lors de l'expression de gènes d'un organisme dans un autre organisme, comme dans le cas d'infections virales ou de surexpression de protéine de

fusion pour une purification (Villaverde & Carrió 2003). La précipitation des protéines peut être due à une protéine mal repliée, une protéine naturellement insoluble en milieu aqueux (une lipoprotéine par exemple) ou lorsque la protéine est toxique pour la cellule. Ceci indique peut-être que PqsC-6His est naturellement insoluble, ce qui pourrait indiquer que c'est une protéine qui est normalement associée avec la membrane chez *P. aeruginosa* (malgré que la protéine est prévu pour une être une protéine cytoplasmique) ou alors qu'un cofacteur présent chez *P. aeruginosa*, mais absent chez *E. coli* BL21(DE3) est nécessaire à la solubilisation de la protéine. Alternativement, il est aussi possible que la précipitation de PqsC-6His soit causée par un mauvais repliement de la protéine possiblement à cause de l'absence d'une protéine chaperonne dans la cellule hôte. Il est aussi possible que le gène *pqsC-6His* qui se trouve sur le plasmide pMSR2 ait subi une mutation qui rend la protéine insoluble. Cette éventualité devra être testée par le séquençage du gène sur le plasmide.

5.2.2 Non-fonctionnalité de la protéine

Comme il a été mentionné dans la section 3.4.1 le gène de *pqsC-6His* a été cloné dans pDN19 et ce vecteur a été transformé dans un mutant *pqsC*⁻ non polaire de *P. aeruginosa* PA14. Une culture de cette souche a été analysée par CL/SM pour la présence de HAQ, ce qui indiquerait que la protéine issue du gène *pqsC-6His* complémente la mutation *pqsC*⁻ non polaire présente chez le mutant. Cependant, aucun HAQ n'a été détecté dans cette culture.

Ceci pourrait s'expliquer par une mutation dans la séquence du gène, ou alors une erreur dans la création du plasmide entraînant la synthèse d'une protéine non fonctionnelle. Il est cependant plus vraisemblable que l'addition de l'étiquette hexahistidine ait interféré avec l'activité de la protéine, soit en bloquant un site catalytique ou un site d'attachement du substrat. Alternativement, l'étiquette aurait pu nuire au bon repliement de la chaîne d'acides aminés qui compose la protéine. Cette hypothèse serait en accord avec le fait que lors de la surexpression dans *E. coli*, la protéine ait été retrouvée dans les corps d'inclusion. Il est donc possible que lorsque exprimée chez *P. aeruginosa*, un mauvais repliement se soit aussi produit, bien que la protéine ait été retrouvée dans un surnageant cytoplasmique par électrophorèse de type Western. PqsC-6His pourrait être soluble dans *P. aeruginosa* dû à la présence de cofacteur, mais tout de même non fonctionnel. L'absence de ces cofacteurs chez *E. coli* BL21 (DE3) expliquerait le manque de solubilité de la protéine dans cette bactérie comme expliquée plus haut.

5.3 Protéine PqsB-6His

La protéine PqsB-6His a été purifiée à partir de la souche BL21 (DE3) de *E. coli* contenant le plasmide pMSR1. En électrophorèse de type Western, la protéine purifiée apparaît à une masse équivalente à celle d'une protéine de 26 kDa alors que, selon sa séquence, elle devrait avoir un poids moléculaire de 32 kDa. Ceci pourrait laisser croire à une dégradation partielle de la protéine quoiqu'aucune trainée n'apparaisse sur le gel. Cependant, il semble que cette valeur de masse erronée ne soit qu'un artefact de l'électrophorèse puisque la protéine est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique à l'étiquette polyhistidine en C-terminal et que l'analyse par spectrométrie de masse des fragments tryptiques montre la présence du peptide N-terminal.

5.3.1 PqsB-6His devient insoluble

Une fois le protocole pour la purification de PqsB-6His mis au point, la protéine qui se retrouvait normalement dans la fraction cytoplasmique n'a plus été détectée que dans les corps d'inclusion. On peut émettre quelques hypothèses pour expliquer ce phénomène. Il se peut que les conditions d'induction utilisées causent un trop grand stress à la cellule et que celle-ci déplace la protéine surexprimée vers les corps d'inclusion pour mieux survivre à ce stress. Les résultats du séquençage du plasmide pMSR1 montrent qu'il n'y a pas de mutations dans le gène *pqsB-6His*. Donc cela élimine la possibilité qu'une mutation soit responsable du changement de solubilité de la protéine. Ce changement pourrait être causé par une différence dans les conditions d'expression du gène. La nature de cette différence reste inconnue.

5.4 Acide dodécanoïque

Pendant le déroulement de nos travaux, Kwan et collaborateurs ont publié en 2011 un article sur l'utilisation de l'acide lyngbyoïque comme inhibiteur du QS chez *P. aeruginosa*. Cette molécule produite par une cyanobactérie marine est un acide gras qui contient un groupement cyclopropane au niveau des carbones 4, 5 et 6 de la molécule (Figure 5.1). Dans

cette étude, les auteurs ont utilisé l'acide dodécanoïque comme contrôle négatif. Ce composé possède une structure similaire à l'acide lyngbyoïque, mais sans le groupement cyclopropane. Les auteurs ont observé que l'ajout d'acide dodécanoïque à une culture de *P. aeruginosa* causait une augmentation de la quantité de l'élastase LasB sécrétée ainsi que de la concentration de pyocyanine dans la culture. Comme ces deux facteurs sont sous le contrôle du QS, ils ont émis l'hypothèse que ces augmentations étaient dues à une activation du QS par l'acide dodécanoïque via une augmentation de la concentration de la 3-oxododecanoyl homoserine lactone (3-oxo-C₁₂ HSL) qui est la molécule de signalisation du système *las*. Bien qu'ils n'aient pas quantifié la 3-oxo-C₁₂ HSL, ils ont observé qu'un mutant $\Delta las/\Delta rhII$ ne démontrait pas cet effet en présence d'acide dodécanoïque, ce qui semble confirmer cette hypothèse. L'augmentation du 3-oxo-C₁₂ HSL s'expliquerait alors par la β -oxydation de l'acide dodécanoïque, pour former l'acide 3-oxododécanoïque, un précurseur du 3-oxo-C₁₂ HSL (Gould *et al.*, 2004). Cependant, nous nous sommes demandés si l'augmentation de la pyocyanine ne serait pas due aussi à une augmentation des HAQ, les molécules de signalisation du système *pqs* qui régulent aussi la production de la pyocyanine (Cao *et al.*, 2001). De la même façon que pour le 3-oxo-C₁₂ HSL, nous avons émis l'hypothèse que la β -oxydation de l'acide dodécanoïque pourrait générer des 3-cétoacides à longues chaînes qui sont généralement considérées comme les précurseurs des HAQ. Une augmentation de la production des HAQ, aurait pour effet d'activer le système *pqs*, ce qui entraînerait une augmentation de la production de pyocyanine.

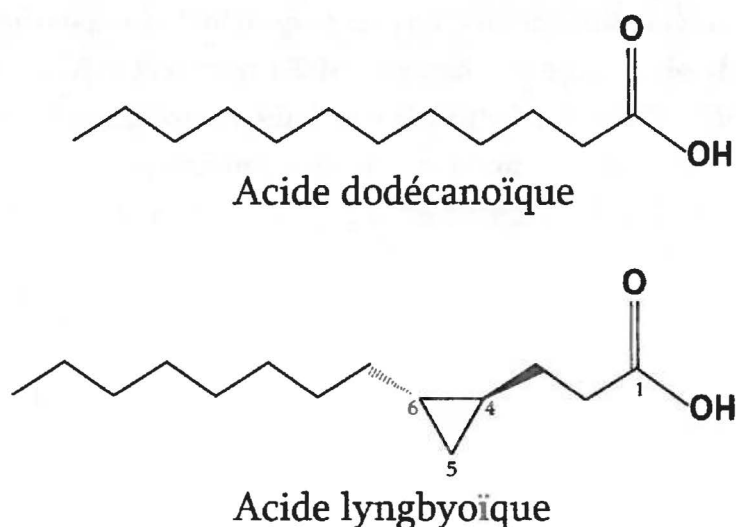


Figure 5.1 Structure de l'acide dodécanoïque et de l'acide lyngbyoïque Adaptée de (Kwan *et al.*, 2011)

Nous avons donc ajouté 1 mM d'acide dodécanoïque à des cultures de *P. aeruginosa* et nous avons observé la forte augmentation de production de pyocyanine telle que mentionnée par Kwan et collaborateurs (2011). Par contre, aucune augmentation significative de la concentration de la 3-oxo-C₁₂ HSL n'a été observée. La concentration des HAQ totaux ne montre également qu'une faible augmentation, mais les HAQ en C₇ comme les HHQ, HQNO et PQS sont significativement plus élevés que dans celle du témoin. Bien que l'expression des gènes de synthèse de la pyocyanine soit sous le contrôle du système *pqs*, qui est à son tour activé en partie par le système *las*, il semble donc que l'augmentation de la concentration en pyocyanine observée en présence d'acide dodécanoïque ne soit pas un produit de l'activation du système *pqs* par *las*, mais plutôt par l'activation directe du système *pqs* par la présence de l'acide dodécanoïque en excès dans la culture.

Afin de vérifier notre hypothèse que l'acide dodécanoïque soit utilisé comme précurseur des HAQ, une concentration de 1mM d'acide dodécanoïque complètement deutéré a été ajoutée à des cultures de *P. aeruginosa* PA14 et la 3-oxo-C₁₂ HSL et les HAQ produits ont été analysés par CL/SM. L'incorporation de l'acide dodécanoïque marqué dans l'une ou l'autre de ces molécules de signalisation sera révélée par un changement dans la masse des molécules correspondantes.

Il a cependant été constaté que l'ajout de 1 mM d'acide dodécanoïque deutéré causait un retard de croissance important par rapport à un contrôle sans ajout et même par rapport à un contrôle contenant 1 mM d'acide dodécanoïque non deutéré. Deux explications ont été envisagées; la présence d'une substance toxique étrangère dans l'acide dodécanoïque deutéré ou un effet toxique lié à la présence du deutérium. Nous avons pu éliminer la première hypothèse en constatant qu'une culture contenant 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré croissait moins rapidement qu'une culture contenant 0.5 mM d'acide dodécanoïque deutéré et 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré. S'il y avait eu une substance toxique étrangère dans l'acide dodécanoïque deutéré qui aurait causé une toxicité pour les bactéries, l'addition d'acide dodécanoïque non deutéré n'aurait pas dû augmenter la croissance. Il semblerait donc que ce soit le remplacement de tous les hydrogènes par des deutériums qui ait été toxique pour la bactérie.

En effet, il a déjà été observé que l'ajout d'acides gras complètement deutérés inhibe la croissance de moisissures (Nguyễn & Vincent, 1976) par rapport aux mêmes composés non deutérés. Quoique l'atome de deutérium soit isostérique par rapport à l'atome d'hydrogène, sa masse étant du double, cela induit un effet isotopique qui peut être important et qui peut se traduire par un ralentissement considérable de réactions enzymatiques qui requièrent une

rupture du lien carbone-deutérium. Il est donc possible que de tels ralentissements dans des voies métaboliques finissent par se traduire par une toxicité de la molécule deutérée. Alternativement, il est aussi possible que les propriétés mêmes de cet acide gras deutéré diffèrent quelque peu de la molécule hydrogénée et que cela se traduise, par exemple, par une déstabilisation des membranes lipidiques des bactéries entraînant un effet toxique.

Afin de pallier à ce problème de toxicité, nous avons dilué notre composé deutéré avec une quantité équivalente du composé hydrogéné. Ceci entraîne nécessairement une diminution de la proportion du marquage des métabolites, mais a restauré le taux de croissance à des valeurs proches de celles obtenues avec 0.5 mM d'acide dodécanoïque non deutéré.

Dans ces conditions, nous avons observé une très forte proportion de HAQ marqués. Les membres de la famille des HAQ en C₇, soit le HHQ et le HQNO montrent l'incorporation de 15 atomes de deutérium. Les membres des mêmes familles en C₉, soit le 4-hydroxy-2-nonylquinoline (HNQ) et le 4-hydroxy-2-nonylquinoline-N-oxide, quant à eux, montrent l'incorporation de 19 atomes de deutérium. Ceci signifie que la chaîne aliphatique de ces composés est entièrement deutérée, ce qui implique l'incorporation complète d'une partie de l'acide dodécanoïque dans ces molécules. L'incorporation de cet acide gras exogène dans les HAQ a nécessairement procédé par la voie de la β -oxydation, un premier cycle de dégradation produisant un intermédiaire en C₁₀ qui est incorporé dans la famille des HAQ en C₉ et un deuxième cycle de dégradation produisant un intermédiaire en C₈ qui est incorporé dans la famille des HAQ en C₇. Le type de marquage utilisé ne permet cependant pas de suivre l'incorporation de tous les atomes de carbones de l'acide dodécanoïque. Cela ne permet que de démontrer que tous les atomes de la chaîne aliphatique des HAQ proviennent de cet acide, sans pouvoir préciser si les carbones en position 2 et 3 proviennent également de cet acide gras.

Il est également intéressant de noter la forte incorporation de deutérium dans les HAQ malgré le fait que le milieu de culture utilisé est très riche en d'autres sources de carbones. Cela pourrait indiquer que la biosynthèse des HAQ, qui survient généralement en fin de phase exponentielle (Lépine *et al.* 2003), pourrait se faire d'une façon importante via la voie de la β -oxydation plutôt que la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras.

Un fait troublant de cette dernière expérience est que même si la proportion d'acide dodécanoïque marqué et non marqué est la même dans le milieu de culture, la proportion de HAQ marqués versus les HAQ non marqués est de 3,28 et non pas de 1,0 si les deux composés étaient également utilisés par les bactéries. Une raison possible pour cette différence serait

que la β -oxydation des acides gras deutérés serait ralentie par l'effet isotopique du deutérium, une hypothèse aussi invoquée pour expliquer la toxicité relative du composé deutéré. Il résulterait donc une accumulation relative d'acides gras deutérés à longue chaîne puisque ceux-ci sont plus longs à dégrader. Ces longues chaînes seraient donc utilisées plus tard dans le cycle de croissance des bactéries pour la synthèse des HAQ, tandis que les acides gras non deutérés seraient dégradés plus rapidement par β -oxydation pour d'autres utilisations.

5.5 Acide octanoïque deutéré

Des résultats d'expériences effectuées au cours de ce présent travail dans le laboratoire du professeur Déziel ont mis en évidence une nouvelle hypothèse pour la biosynthèse des HAQ. Cette expérience utilise des mutants *pqsB*⁻ ou *pqsC*⁻ non polaires ne produisant pas de HAQ, mais dans lesquels les gènes *pqsA* et *pqsD* sont fonctionnels. De même, un double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ ne produisant pas de HAQ, mais dont les gènes *pqsC* et *pqsB* demeurent fonctionnels a été utilisé. Dans cette expérience, le surnageant d'une culture du mutant *pqsB*⁻ ou *pqsC*⁻ non polaire a été ajouté à une culture du double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ et cette dernière culture a donné du HHQ. Donc un intermédiaire extracellulaire a été produit par l'action de PqsA et de PqsD et cet intermédiaire a été utilisé par PqsB et PqsC pour produire du HHQ.

Une expérience similaire à l'expérience précédente a été ensuite réalisée dans le laboratoire du professeur Déziel. Dans cette expérience, le mutant *pqsC*⁻ non polaire a été mis en culture dans un milieu minimal avec comme seule source de carbone de l'acétate complètement marqué avec du carbone ¹³. Le surnageant de cette culture a ensuite été donné au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ dans un milieu riche non marqué. En parallèle, une expérience similaire a été réalisée dans laquelle le mutant *pqsC*⁻ non polaire a été mis en culture dans un milieu riche non marqué et le double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ a été cultivé dans un milieu ne contenant que de l'acétate marqué. Les résultats ont montré que dans la première expérience le HHQ produit avait un marquage de +1 Dalton, tandis que dans la seconde expérience, le HHQ était marqué avec +8 Daltons.

Ces deux expériences mènent à l'hypothèse que la synthèse des HAQ se ferait en deux étapes. La première étape, qui requiert PqsA et PqsD, serait la même pour le HHQ que pour le DHQ.

Elle impliquerait donc l'addition d'un acide malonique à l'acide anthranilique, une addition qui se ferait suite à une décarboxylation pour générer un dérivé 2-aminobenzoylacetate (2-ABA) sur lequel serait ajouté, dans une deuxième étape, une queue aliphatique par l'action de PqsB et de PqsC (Figure 5.2). Cependant, dans ce scénario la queue aliphatique ne pourrait pas provenir d'un 3-cétoacide, mais devrait provenir d'un acide gras. En effet, l'hypothèse du 3-cétoacide (Figure 5.3) implique que le carbone en position 3 provienne du carbone en position 2 du 3-cétoacide, mais l'expérience avec le mutant *pqsC*⁻ en milieu acétate marqué indique plutôt que le marquage à cette position proviendrait d'un dérivé du malonate comme dans la biosynthèse du DHQ, ce dérivé du malonate originant de la carboxylation de l'acétate tel qu'évoqué par Ritter et Zhang (Ritter *et al.* 1971; Zhang *et al.* 2008). De plus, l'expérience avec le surnageant du mutant *pqsC*⁻ cultivé en milieu non marqué et mis en présence du double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ en milieu contenant de l'acétate marqué montre une augmentation de 8 Daltons pour le HHQ, ce qui correspondrait à un marquage de la queue aliphatique (sept carbones) et du carbone en position 2. Donc ces expériences tendent à démontrer que l'intermédiaire dont seraient dérivés les atomes de carbone de la queue aliphatique et du carbone en position 2 serait un acide gras, plus précisément l'acide octanoïque, en ce qui a trait au HHQ.

Afin de vérifier cette hypothèse, de l'acide octanoïque deutéré a été ajouté à des cultures de PA14. Tout comme précédemment, un mélange équimolaire (0.5 mM) d'acide octanoïque deutéré et non deutéré a été utilisé pour pallier au même problème de toxicité observé avec l'acide dodécanoïque deutéré. Les résultats montrent qu'une grande proportion du HHQ produit présente un marquage de +15 Daltons. Ceci prouve que l'acide octanoïque exogène est bel et bien incorporé dans le HHQ, ce qui va dans le sens de notre hypothèse. En effet, si un 3-cétoacide issu de la β -oxydation de l'acide octanoïque avait été le précurseur, on aurait vu l'apparition d'un analogue du HHQ en C₅ marqué avec 11 deutériums, ce qui n'a pas été observé. Cette expérience permet aussi de tester l'hypothèse que l'addition de deux carbones issus d'une molécule d'acétate sur l'acide octanoïque pourrait former l'acide 3-cétodécanoïque qui serait le précurseur de la queue aliphatique. Dans ce cas, il y aurait production de HNQ marqué avec 15 deutériums pour donner rapport m/z de 287. Un ion est effectivement observé à m/z 287 au temps de rétention correspondant au HNQ, mais cet ion ne représente que 3% de celui correspondant au HHQ marqué avec 15 deutériums, ce qui indique que cette voie de biosynthèse est très peu importante. Ce résultat pourrait d'ailleurs aussi être interprété par la formation d'acide décanoïque à partir de l'acide octanoïque, ce qui serait en accord avec notre hypothèse, mais la preuve demeure que l'acide octanoïque est le

principal précurseur du HHQ et donc que des 3-cétoacides ne sont pas les précurseurs principaux des HAQ.

Il faut noter cependant que dans les conditions standards de culture, l'analogue en C₅ du HHQ ne soit présent qu'à l'état de traces. Il est donc vraisemblable que les systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse des HAQ préfèrent des précurseurs à chaînes plus longues qu'en C₆, ce qui pourrait avoir introduit un biais dans l'expérience avec l'acide octanoïque. De plus, cet acide était ajouté de façon exogène et n'était donc pas issu de la β -oxydation. Pour répondre à ces questions et pour arrimer les résultats obtenus avec l'acide dodécanoïque avec ceux obtenus avec l'acétate marqué, nous avons répété cette dernière expérience en remplaçant l'acétate marqué par l'acide dodécanoïque marqué ajouté soit en première étape dans la culture d'un mutant *pqsB*⁻ ou en deuxième étape dans la culture du double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻. Lorsque l'acide dodécanoïque marqué a été fourni au mutant *pqsB*⁻ et le surnageant donné au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻, de très faibles quantités de HHQ marqué ont été observées, alors que lorsque l'acide dodécanoïque marqué a été fourni au double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻ ayant reçu le surnageant de *pqsB*⁻ cultivé sans marquage, on a observé un fort marquage des HAQ. Le premier résultat s'explique probablement par des traces d'acide dodécanoïque marqué résiduelles qui auraient contaminé la culture du double mutant *pqsA*⁻ non polaire *pqsH*⁻. Quant au second résultat, il démontre que la queue aliphatique des HAQ est ajoutée par l'action de PqsB et de PqsC et donc que le précurseur formé par l'action de PqsA et de PqsD ne possède pas de queue aliphatique.

Ce résultat combiné avec les résultats précédents nous confirme donc que les précurseurs des HAQ sont des acides gras et non pas des 3-cétoacides, et que ceux-ci peuvent provenir de la β -oxydation d'acides gras à longues chaînes. Ces acides gras sont couplés, par l'intermédiaire de PqsC et PqsB, sur un précurseur dérivé de l'acide anthranilique et d'un dérivé de l'acide malonique dans une voie de biosynthèse apparentée à celle du DHQ.

Comment donc concilier nos conclusions avec celles des auteurs précédents, comme Luckner et Bredenbruch qui prétendaient avoir démontré que les 3-cétoacides étaient les précurseurs des HAQ? En fait ce que ces auteurs ont vraiment démontré à l'aide d'expériences utilisant de l'acétate marqué au ¹³C ou au ¹⁴C en position 1 ou 2, c'est que la chaîne aliphatique des HAQ était issue de la synthèse *de novo* des acides gras, ce qui est compatible avec nos résultats. Là où réside la différence, c'est que ces deux publications n'ont en fait seulement démontré que le carbone en position 2 des HAQ provenait du carbone 1 de l'acétate et que le carbone 3 des

HAQ provenait du carbone 2 de l'acétate. Ceci s'inscrit en effet dans la voie de biosynthèse normale des acides gras et correspondrait au marquage observé des HAQ si le précurseur était un 3-cétoacide, qui était l'hypothèse première soulevée par Cornforth et James (1956) qui ont été les premiers à élucider la structure des HAQ. Ce que les travaux du laboratoire du Pr Déziel ont depuis démontré, c'est la présence d'un intermédiaire qui incorpore un atome de carbone qui origine aussi du carbone 2 de l'acétate, vraisemblablement le carbone 2 d'un dérivé de l'acide malonique qui est issu de l'addition de CO₂ sur l'acétate sous l'action de l'enzyme acetyl-CoA carboxylase. Quant au carbone en position 2 des HAQ, nos travaux indiquent qu'il provient tout simplement du carbone 1 des acides gras, lesquels sont aussi issus du carbone 1 de l'acide acétique.

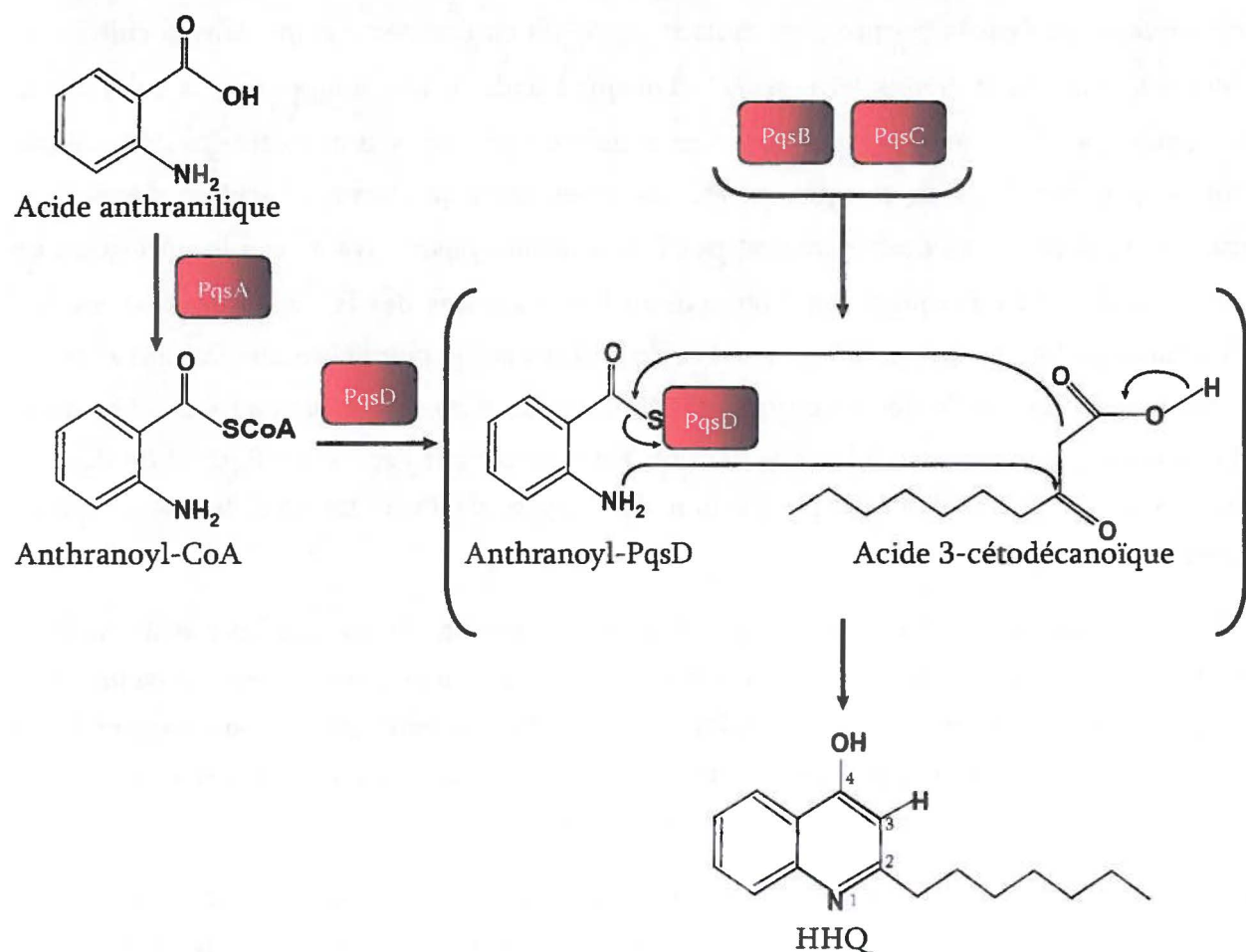


Figure 5.2 Schéma de la synthèse du HHQ correspondant à l'hypothèse du 3-cétoacide comme précurseur des HAQ. Adapté de (Zhang *et al.* 2008)

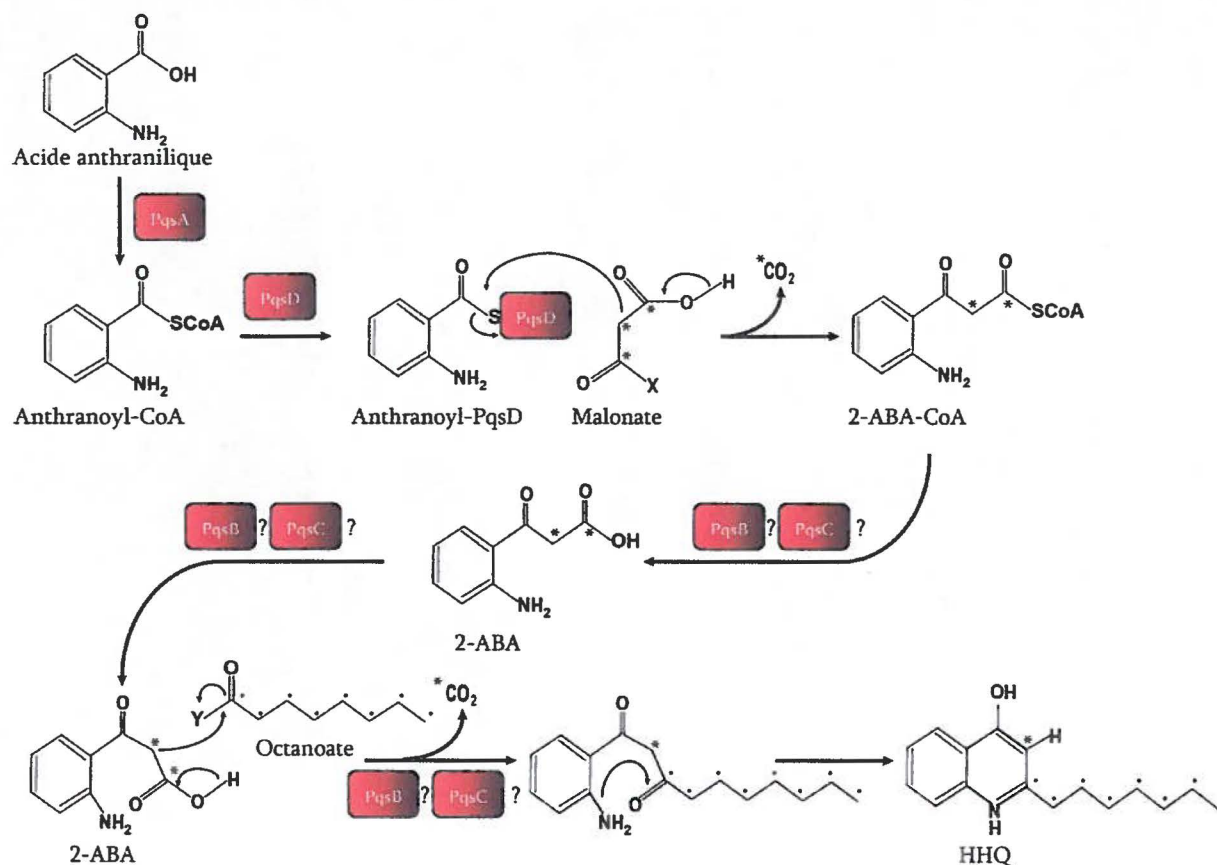


Figure 5.3 Schéma de la synthèse du HHQ correspondant à l'hypothèse des acides gras comme précurseurs des HAQ. X= OH?, SCoA?, Y= OH? SCoA?, PqsB?, PqsC? Les étoiles marquent les positions des carbones 13 du malonate utilisées lors de la première expérience de marquage de Valérie Dekimpe (Institut Armand-Frappier, laboratoire du professeur Éric Déziel, communication personnelle). Les points marquent les positions des carbones 13 de l'octanoate utilisé pour la deuxième expérience de marquage de Valérie Dekimpe.

CONCLUSION

Au cours des travaux présentés ici, une méthode a été mise au point pour exprimer PqsB-6His chez *E. coli* BL21 (DE3) et ensuite purifier cette protéine par chromatographie d'affinité au nickel. Le succès de cette méthode reste variable et celle-ci devra être perfectionnée. Bien que la protéine ait été purifiée avec succès, celle-ci a été mal conservée et altérée suite à sa congélation dans l'eau, peu d'information a pu être obtenue. De plus, pour effectuer des tests enzymatiques, il aurait été nécessaire d'avoir la protéine PqsB ainsi que la protéine PqsC.

Il a aussi été démontré que les protéines PqsB et PqsC sont les protéines responsables de l'ajout de la chaîne aliphatique du HHQ. En effet, il est apparent que la structure du précurseur produit par l'action des protéines PqsA et PqsD ne contient pas la chaîne aliphatique, celle-ci étant ajoutée aux étapes subséquentes de la voie de biosynthèse.

De plus, l'acide gras qui forme cette chaîne aliphatique n'est pas issu de la synthèse *de novo* des acides gras, mais serait un produit de la β -oxydation d'acide gras à longue chaîne. Il a aussi été mis en évidence que l'acide gras qui est ajouté au précurseur formé par l'acide anthranilique n'est pas un acide 3-céto décanoïque, mais serait un acide octanoïque.

Ces résultats ont mené à une nouvelle hypothèse sur la synthèse du HHQ. L'acide anthranilique serait activé par PqsA et ensuite condensé avec une molécule de malonyl-CoA par la protéine PqsD. L'intermédiaire résultant subirait une décarboxylation avant d'être utilisé comme substrat par PqsB et PqsC qui ajouteraient une molécule d'acide octanoïque à celle-ci. Une deuxième décarboxylation initierait l'attaque du carbonyle d'un acide gras ce qui serait suivi d'une cyclisation terminant la synthèse du HHQ.

Une suite intéressante de ces travaux serait de purifier la protéine PqsC. Ceci permettrait de confirmer cette nouvelle hypothèse en effectuant des tests enzymatiques *in vitro*. La purification de la protéine PqsC pourrait être accomplie en utilisant une méthode différente, par exemple l'utilisation d'une étiquette différente telle la "maltose binding protein". Cette approche aide la solubilisation de la protéine de fusion en plus de servir d'étiquette d'affinité pour la purification. Une autre possibilité serait de purifier la protéine dans son état non soluble et d'utiliser des méthodes pour resolubiliser la protéine. Le danger de cette approche réside dans l'activité inconnue de la protéine. De ce fait, la fonctionnalité de la protéine ne peut pas être vérifiée après resolubilisation. Il est donc impossible de savoir si un test *in vitro* subséquent ne produirait pas les résultats attendus suite à une protéine non fonctionnelle ou plutôt à des conditions utilisées dans lesquelles la protéine ne fonctionne normalement pas.

D'autres tests intéressants pour le futur seraient des tests de marquage en utilisant des composés marqués au carbone 13. Ceci emmènerait une plus grande certitude sur la provenance du marquage des HAQ. Grâce à un effet isotopique moindre du ^{13}C par rapport au ^{12}C relativement au deutérium versus l'hydrogène, de tels composés marqués seraient vraisemblablement beaucoup moins toxiques pour les cellules, ce qui n'affecterait pas la croissance des bactéries ou la cinétique d'utilisation du composé lors de l'ajout de ces composés à une culture.

APPENDICE A

Composition des solutions et milieux de culture

MILIEU DE CULTURE

Milieu liquide

TSB

Tryptic soy broth: 30.0 g

H₂O Mili-Q: 1 L

Milieu solide

TSB agar

Tryptic soy broth: 15.0 g

Agar: 7.5 g (1.5% p/v)

H₂O Mili-Q: 500 mL

SOLUTIONS

Solutions des expériences de marquage

Solution stock d'acide octanoïque

Acide octanoïque ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$): 100 mM

MeOH : 1 mL

Solution stock d'acide octanoïque marqué

Acide octanoïque d19 ($\text{C}_8\text{D}_{15}\text{HO}_2$): 100 mM

MeOH : 1 mL

Solution stock d'acide dodécanoïque

Acide dodécanoïque ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$): 100 mM

MeOH : 1 mL

Solution stock d'acide dodécanoïque marqué

Acide dodécanoïque d23 ($\text{C}_{12}\text{D}_{23}\text{HO}_2$): 100 mM

MeOH : 1 mL

Solutions pour les expériences de biologie moléculaire

Solution de transformation par choc thermique

CaCl₂: 50 mM

H₂O Milli-Q: 250 mL

Solution filtré avec filtre 0.22 µm

Tampon TAE (Tris Acetate EDTA) 50x

Tris : 2 M (1x : 40 mM)

Acide acétique : 1 M (1x : 20 mM)

EDTA : 50 mM (1x : 1 mM)

pH : 8.4

H₂O Mili-Q: Compléter à 1 L

Diluer 1/50 avec de l'eau mili-Q avant utilisation

Gel d'agarose 1%

Agarose : 0.5 g (1% p/v)

Tampon TAE 1x : 50 mL

Tampon de chargement 6x

Xylène cyanol : 0.20 % (p/v)

Bleu de bromophénol : 0.20 % (p/v)

Orange G : 0.20 % (p/v)

Glycérol : 30% (v/v)

Dans H₂O Mili-Q

Solution pour les expériences de protéomique

Solution stock d'IPTG

IPTG: 100 mM

H₂O Mili-Q: Compléter à 5 mL

Solution filtré avec filtre 0.22 µm

Solution conservée à -20°C

Solutions d'imidazole

Tampon d'attachement

Imidazole : 20 mM

NaCl : 600 mM

pH 7.5

Solution de lavage 1

Imidazole : 20 mM

NaCl : 300 mM

pH 7.5

Solution de lavage 2

Imidazole : 50 mM

NaCl : 300 mM

pH 7.5

Solution de lavage 3

Imidazole : 100 mM

NaCl : 300 mM

pH 7.5

Solution d'élution

Imidazole : 250 mM

NaCl : 300 mM

pH 7.5

Tampon de conservation

HEPES 20 mM

EDTA 0.5 mM

Glycérol 15% (v/v)

pH 8.0

La composition du tampon de conservation a été obtenue du laboratoire du professeur Marvin Whiteley et incluait originalement 1 mM de DTT, mais cette composante a été omise dû au risque que cette molécule puisse interférer avec l'activité de PqsB-6His.

Solutions pour électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Gel de polyacrylamide de concentration (4% acrylamide)

Solution stock d'acrylamide (30%)/bis-acrylamide(2.67%) : 325 µL

H₂O Mili-Q : 1.51 mL

Tampon Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 : 625 µL

Solution SDS 10% : 25 µL

Solution d'ammonium persulfate 10% : 12.5 µL

TEMED : 2.5 μ L

Volume total : 2.5 mL

Gel de polyacrylamide de séparation (12% acrylamide)

Solution stock d'acrylamide (30%)/bis-acrylamide(2.67%) : 4.0 mL

H₂O Mili-Q : 3.35 mL

Tampon Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 : 2.5 μ L

Solution SDS 10% : 100 μ L

Solution d'ammonium persulfate 10% : 50 μ L

TEMED : 5 μ L

Volume total : 10.0 mL

Solution tampon de chargement selon la méthode de Laemmli (2x)

SDS : 4%

Glycérol : 20%

β -mercaptoéthanol : 10%

Bleu de bromophénol : 0.004%

Tris HCl : 125 mM

Dans H₂O Mili-Q

Solution de coloration Bleu de Coomassie

Acide acétique glacial : 10% (v/v)

Bleu de Coomassie : 0,025% (p/v)

MeOH : 40% (v/v)

Solution de décoloration

Acide acétique glacial : 10% (v/v)

MeOH : 40% (v/v)

Solution pour immunobuvardage de type Western

Solution tampon Tris-saline (TBS, Tris Buffered Saline)

Tris : 25 mM

NaCl : 150 mM

pH 7.5

Solution de lavage des membranes

Tris : 25 mM

NaCl : 500 mM

Triton X-100 : 0.2% (v/v)

Tween-20 : 0.05% (v/v)

Solvant utilisé lors d'analyse par CL/SM

Solvant A

H₂O Mili-Q: 99% (v/v)

Acide acétique glacial : 1% (v/v)

Solvant B

Acétonitrile : 99% (v/v)

Acide acétique glacial : 1% (v/v)

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Aloul, M. (2004). Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*, 59(4), 334-336.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., David, R. H. & Kompala, D. S. (1990) Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. and Bioeng.*, 35(7), 668-681
- 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(36), 8644-8655.
- Bergey, D. H., & Breed, R. S. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology. *American Society for Microbiology; Baltimore, Williams & Wilkins Co.* 89-91
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Fiandaca, M. J., Pedersen, J., Hansen, C. R., Andersen, C. B., Pressler, T., Givskov M., & Høiby, N., (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulm.*, 44(6), 547-558.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Jakobsen, T. H., Phipps, R., Nielsen, A. K., Rybtke, M. T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Høiby, N., & Coifu, O.,(2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PloS One*, 5(4), e10115.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., & Müller, R., & Häussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187(11), 3630-3635.
- Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.*, 177(24), 7155-7163.
- 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. *PNAS USA*, 98(25), 14613-14618.
- 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. Meth.*, 64(3), 391-397.

- Cloughs, R. C., Matthis, L., Barnums, R., & Jaworski, J. G., (1992). Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. *J. Biol. Chem.*, 267(29), 20992-20998.
- Coleman, J. P., Hudson, L. L., McKnight, S. L., Farrow, J. M., Calfee, M. W., Lindsey, C. A., & Pesci, E. C. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J. Bacteriol.*, 190(4), 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(1), 41-46.
- Cornforth, J. W., & James, A. T. (1956). Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. *BJ Structure*, 63(1), 124-130.
- Costerton, J. W. (2007). *The Biofilm Primer*. (J. William Costerton, Ed.) (Vol. 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 5-34
- Cox, C. D., & Parker, J. (1979). Use of 2-Aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 9(4), 479-484.
- Davies, C., Heath, R. J., White, S. W., & Rock, C. O. (2000). The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli*. *Structure*, 8(2), 185-195.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- Deep, A., Chaudhary, U., & Gupta, V. (2011). Quorum sensing and bacterial pathogenicity: From Molecules to Disease. *J. Lab. Phys.*, 3(1), 4-11.
- Dekimpe, V., & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155(3), 712-723.
- 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(4), 998-1014.

- 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. *PNAS USA*, 101(5), 1339-1344.
- Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cámara, 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(1), 87-96.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, 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(1), 29-43.
- Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., An, S.-W., Xu, J.-L., & Zhang, L.-H. (2008). A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun. Integr. Biol.*, 1(1), 88-96.
- Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416(6882), 740-743.
- Duerkop, B. A., Varga, J., Chandler, J. R., Peterson, S. B., Herman, J. P., Churchill, M. E., Parsek, M. R., Nierman, W. C., & Greenberg, E. P., (2009). Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *J. Bacteriol.*, 191(12), 3909-3918.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.*, 20(9), 2444-2449.
- Engbrecht, J., & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *PNAS USA*, 81(13), 4154-4158.
- Farrow, J. M., & Pesci, E. C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J. Bacteriol.*, 189(9), 3425-3433.
- Farrow, J. M., 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(21), 7043-7051.

- Funatsu, G., Nierhaus, K., & Wittmann, H. G. (1972). Ribosomal proteins. XXXVII. Determination of allele types and amino acid exchanges in protein S12 of three streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 287(2), 282-291.
- Fuqua, W. C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Gen.*, 35, 439-468.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Minireview: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176(2), 269-275.
- 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.
- Gallagher, L. A., & Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J. Bacteriol.*, 183(21), 6207-6214.
- 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(9), 3000-3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S., & Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.*, 61(4), 1180-1184.
- Gould, T. A., Watson, W. T., Choi, K. H., Schweizer, H. P., & Churchill, M. E. A. (2004). Crystallization of *Pseudomonas aeruginosa* AHL synthase LasI using beta-turn crystal engineering. *Acta Crystallogr. D*, 60(Pt 3), 518-520.
- Gray, K. M., & Garey, J. R. (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology*, 147(8), 2379-2387.
- Green, M., Apel, A., & Stapleton, F. (2008). A longitudinal study of trends in keratitis in Australia. *Cornea*, 27(1), 33-39.
- Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Gen.*, 29, 477-508.

- 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. *PNAS USA*, *100*(5), 2771-2776.
- Hays, B. Y. E. E., Wells, I. C., Jacobs, F. A., Thayer, S. A., & Wade, J. (1945). Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, *196*(1):331-340
- He, Jianxin, Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M., & Rahme, L. G., (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *PNAS USA*, *101*(8), 2530-2535.
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, *112*(9), 1300-1307.
- Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., & Lindqvist, Y. (1998). Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J.*, *17*(5), 1183-1191.
- Jensen, Peter Ø, Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., & Høiby, N., (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing- controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 1329-1338.
- Kaiser, D. (2008). *Myxococcus* from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annu. Rev. Gen.*, *42*, 109-130.
- Kaplan, H. B., & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Microbiology*, *163*(3), 1210-1214.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, *49*(3), 581-590.
- Kesarwani, M., Hazan, R., He, J., Que, Y., Apidianakis, Y., Lesic, B., Xiao, G., Dekimpe, V., Milot, S., Déziel, E., Lépine, F., & Rahme, L. G., (2011). A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS Pathog.*, *7*(8), e1002192.
- Kim, W., & Surette, M. G. (2005). Prevalence of surface swarming behavior in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, *187*(18), 6580-6583.

- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., & de Vos, W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24(5), 895-904.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., Mahdouani, K., Hentati, H., & Bakhrouf, A. (2011). Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiol.*, 11(1), 155-162.
- Kwan, J. C., Meickle, T., Ladwa, D., Teplitski, M., Paul, V., & Luesch, H. (2011). Lyngbyoic acid, a "tagged" fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biosyst.*, 7(4), 1205-1216.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechère, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.*, 182(21), 5990-5996.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685
- 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(6), 1137-1146.
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M.-H., Millot, S., Stachel, S., Aria Tzika, A., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G., (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog.*, 3(9), 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).
- 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(1), 36-41.
- Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J., & Rahme, L. G. (2004a). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15(6), 862-869.
- Lépine, F., Dekimpe, V., Lesic, B., Milot, S., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rahme, L. G., & Déziel, E., (2004b). 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(8), 839-845.
- Malone, C. L., Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2007). Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* autoinducing peptides by using the synechocystis DnaB mini-intein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(19), 6036-6044.
- Mamoru, K. (1958). Studies on the biosynthesis of pyocyanine (II) isolation and determination of pyocyanine. *B. Inst. Chem. Res., Kyoto University*, 36, 174-187.
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53(1), 159-162.
- Mann, S. (1966). Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Mikrobiol.*, 54(2), 184-190.
- Marx, C. J., & Lidstrom, M. E. (2001). Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 147(8), 2065-2075.
- Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057), 422-425.
- Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2004). Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, 6(3), 218-226.
- McFall-Ngai, M. J., & Ruby, E. G. (1991). Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. *Science*, 254(5037), 1491-1494.
- 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(1), 27-34.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H., & Everett, C. (2000). The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182(10) 2702-2708.
- Mitchell, G., Séguin, D. L., Asselin, A.-E., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S., & Malouin, F., (2010). *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-

- colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol.*, 10(33).
- Nguyễn, N.-D., & Vincent, J. (1976). Studies on the biological effects of deuteriated organic compounds. Test substances synthesis of perdeuteriated fatty acids dermatophytes. *Mycopathologia*, 58(3), 137-148.
- 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(6), 2911-2919.
- Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H., & Prince, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.*, 68(7), 4331-4334.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *PNAS USA*, 91(1), 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS USA*, 92(5), 1490-1494.
- 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(18), 5756-5767.
- 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*. *PNAS USA*, 96(20), 11229-11234.
- 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(10), 3127-3132.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., & Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.*, 175(22), 7363-7372.
- Que, Y.-A., Hazan, R. C., Ryan, M., Milot, S., Lepine, F., Lydon, M., & Rahme, L. G. (2011). Assessment of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) production in acute burn wounds infected with *P. aeruginosa*. *J. Pathog.*

- Queck, S.-Y., Weitere, M., Moreno, A. M., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2006). The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, 8(6), 1017-1025.
- 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(5219), 1899-1902.
- Ritter, C., & Luckner, M. (1971). Zur biosynthese der 2-n-Alkyl-4-hydroxychinolinderivate (Pseudane) bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Biochem.* 18, 391-400.
- Schaber, J. A., Triffo, W. J., Suh, S. J., Oliver, J. W., Hastert, M. C., Griswold, J. A., Auer, M., Hamood, A. N., & Rumbaugh, K. P., (2007). *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect. Immun.*, 75(8), 3715-3721.
- 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(7), 2066-2079.
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 81-104.
- Singh, P. K., Schaefer, a L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., & Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407(6805), 762-764.
- Sintim, H., Smith, J., Wang, J., Nakayama, S., & Yan, L. (2010). Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future Med. Chem.*, 2(6), 1005-1035.
- Spormann, A. M. (1999). Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(3), 621-641.
- Takeda, R., (1959). Isolation of substance B from the culture of *Pseudomonas aeruginosa* T 359. *Hakko Koyaku Zasshi*, 37(59), 63.
- 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(8), 2003-2010.
- Topcu, Z. (2000). An optimized recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. *Acta Biochim. Pol.*, 47(3), 841-846.

- Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F., & Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9(10), 2622-2630.
- Trias, J., Dufresne, J., Levesque, R. C., & Nikaido, H. (1989). Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33(8), 1202-1206.
- Ulitzur, S., & Hastings, J. W. (1979). Autoinduction in a luminous bacterium: A confirmation of the hypothesis. *Curr. Microbiol.*, 2(6), 345-348.
- Villaverde, A., & Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotech. Lett.*, 25(17), 1385-1395.
- Weitere, M., Bergfeld, T., Rice, S. A., Matz, C., & Kjelleberg, S. (2005). Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode. *Environ. Microbiol.*, 7(10), 1593-1601.
- Wells, C. (1951). Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Syntheses of PYO Ib, PYO Ic, and PYO III. *J. Biol. Chem.*, 196, 331-340.
- Winzer, K., Hardie, K. R., & Williams, P. (2002). Bacterial cell-to-cell communication : sorry, can't talk now — gone to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 216-222.
- Xiao, G., Déziel, E. D., He, J., Lépine, F. L., Lesic, B., Castonguay, M. H., Milot, S., Tampakaki, A. P., Stachel, S. E., & Rahme, L. G., (2006). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.*, 62, 1689-1699.
- Yi, A.-R., Lee, S.-R., Jang, M.-U., Park, J.-M., Eom, H.-J., Han, N. S., & Kim, T.-J. (2009). Cloning of dextransucrase gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and its high-level expression in *E. coli* by low temperature induction. *J. Microbiol. Biotech.*, 19(8), 829-835.
- Yu, S., Jensen, V., Seeliger, J., Feldmann, I., Weber, S., Schleicher, E., & Häussler, S., (2009). Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) response protein. *Biochemistry*, 48, 10298-10307.

Zhang, Y.-M., Frank, M. W., Zhu, K., Mayasundari, A., & Rock, C. O. (2008). PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Biol. Chem.*, 283(43), 28788-94.

