Université du Québec

Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

Étude du rôle de PqsB et PqsC, des enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ chez *Pseudomonas aeruginosa*

Par Carlos Eduardo Dulcey Jordan

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences M.Sc. Lors du programme de Maîtrise en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury	Philippe Constant (INRS-Institut Armand-Frappier)
Examinateur Externe	Annie Castonguay (Université McGill)
Directeur de recherche	François Lépine (INRS-Institut Armand-Frappier)

© Droits réservés de Carlos Eduardo Dulcey Jordan, Août 2013

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste responsable de certaines infections persistantes chez les plantes et les animaux. P. aeruginosa produit une grande quantité de facteurs de virulence, dont plusieurs sont contrôlés par le « quorum sensing » (QS). Chez P. aeruginosa l'un de ces systèmes de QS est le système MvfR, dans lequel, le régulateur transcriptionel MvfR contrôle l'expression des opérons pgsABCDE et phnAB codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des molécules de signalisation qui appartiennent à la famille des 4-hydroxy-2alkylguinolines (HAQ). Des études récentes réalisées dans les laboratoires des Professeurs François Lépine et Eric Déziel ont montré que la biosynthèse des HAQ est un mécanisme à deux étapes. La seconde étape implique un composé intermédiaire soit l'acide 2-aminobenzoylacétique (2-ABA), l'octanoyl-CoA ainsi que les enzymes PqsB et PgsC codées par l'opéron pgs. L'objectif principal de ce projet était l'étude du rôle de PgsB et PgsC. Nous avons co-produit ces enzymes sous forme recombinante et nous les avons co-purifiées par chromatographie d'affinité. PgsC a été étudiée par spectrométrie de masse et par mutagénèse dirigée. Nous avons déterminé que PqsC lie l'octanoyle dans le résidu Cys 129 et le transporte lors d'une réaction de condensation avec le 2-ABA. Nous avons aussi reproduit in vitro la deuxième étape de la voie de biosynthèse des HAQ. Ces résultats permettront de faciliter la recherche d'inhibiteurs potentiels pour bloquer la biosynthèse des HAQ et ainsi affaiblir le potentiel pathogène de P. aeruginosa.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen which is responsible for some persistent infections in plants and animals. P. aeruginosa produces a large number of virulence factors many of which are controlled by the quorum sensing (QS). In P. aeruginosa, one of these QS systems is the MvfR system, in which the transcriptional regulator MvfR controls the expression of the pgsABCDE and phnAB operons encoding for the enzymes involved in the biosynthesis of some small signaling molecules belonging to the family of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ). Recent studies carried in the laboratories of Professors François Lépine and Eric Déziel have shown that HAQ biosynthesis is a two-step mechanism. The second step involves an intermediate compound known as 2-aminobenzoylacetic acid (2-ABA), octanoic acid and the PqsB and PqsC enzymes encoded by the pqs operon. The main objective of this project was to study the role of PgsB and PgsC. To do this, these enzymes were coproduced in a recombinant manner and they were co-purified by affinity chromatography. PgsC was studied by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. These approaches led us to determine that PqsC binds octanoic acid at its cysteine 129 residue and is involved in the coupling reaction with 2-ABA. We have also reproduced in vitro the second step of the HAQ biosynthesis using PqsB, PqsC, octanoic acid and 2-ABA. This constitutes a novel target to develop inhibitors of the HAQ biosynthesis pathway which may eventually lead to the inhibition of the QS-MvfR system in P. aeruginosa.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à témoigner ma gratitude :

au Professeur François Lépine qui m'a accepté dans son équipe de recherche et pour la confiance qu'il a placé en moi pour le développement de ce projet. J'ai bien apprécié sa direction, sa disponibilité, son soutien dans les moments les plus difficiles, sa patience, ses apports et ses conseils professionnels. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour avoir accepté d'être mon directeur de recherche.

au Professeur Eric Déziel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour son soutien tout au long de mon projet.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Nicolas Doucet pour ses remarques constructrices à propos de la production de protéines recombinantes et leur purification.

Ma reconnaissance s'adresse à Sylvain, Anastasia, Marie-Christine, David, Ahmad, Donald, Guillaume et Esther, pour leur gentillesse et l'aide technique qu'ils m'ont apporté.

Merci encore à Sylvain et Anastasia pour leur implication et l'accompagnement qu'ils m'ont offert tout au long de ma maîtrise ainsi que pour nos discussions techniques et amicales accompagnées d'une bonne tasse de café.

Je remercie bien mes amis et mes collègues du GRME, Karla, Liliana, Christine, Servane, Laure, Arvin, Marc-André, Donat et Snizhana pour les bons moments que nous avons partagés ensemble et pour arriver encore à me supporter.

Merci à mes amis proches au Canada, Guillermo, Colette, Carmen, François et Patrick ainsi qu'à mes amis en Colombie Laura Pegui, Gloria et Marcela. À mes sœurs et à mon frère, à ma mère et à mon père, à qui je dois des encouragements les plus précieux, merci d'avoir toujours eu confiance, et de m'accompagner aussi affectueusement. Je vous dédie mon projet de maîtrise.

A mis hermanas y mi hermano, a mi mamá y a mi papá, a quienes debo el apoyo más preciado, gracias por haber confiado siempre en mí, y por acompañarme cariñosamente durante mis estudios. A ustedes dedico mi proyecto de maestria.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés dans ce projet de maîtrise.

Encore une fois, merci.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	IV
Remerciements	V
Table des matières	VII
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XI
_iste des abréviations	XII
Nise en contexte	XIV

Étude du rôle de PqsB et PqsC dans la biosynthèse de HHQ chez *Pseudomonas* aeruginosa.

SYNTHÈSE

1	Le système de quorum sensing MvfR 2		
	1.1 Introduction 2		
	1.1.1	Quorum sensing2	
	1.1.2	Quorum sensing chez les bactéries Gram négatives 2	
	1.1.3	Quorum sensing chez Pseudomonas aeruginosa4	
	1.1.4	Le système MvfR5	
	1.1.5	Hiérarchie des systèmes de quorum sensing chez Pseudomonas aeruginosa 8	
	1.2 Biosy	/nthèse des HAQ11	
	1.2.1	Biosynthèse de l'acide anthranilique12	
	1.2.2	Les 3-cétoacides comme étant des précurseurs de HAQ13	
	1.2.3	Activation de l'acide anthranilique16	
	1.2.4	Biosynthèse de DHQ17	
	1.2.5	Réévaluation de l'hypothèse du mécanisme de biosynthèse à une seule	
		étape 19	
	1.2.6	Réévaluation de l'hypothèse du précurseur 3-cétoacide	
	1.2.7	Rôle de PqsB et PqsC24	

1.3 Hypothèse 25		25
1.4 Obje	ctif du projet	25
1.4.1	Objectif général	25
1.4.2	Objectifs spécifiques	25

ARTICLE

2	Article.		28
	2.1 Cont	ribution	29
	2.1.1	Construction des vecteurs d'expression 6xHis-pqsC (pCD3 et pCD4)	29
	2.1.2	Optimisation de la production et purification de PqsB	30
	2.1.3	Optimisation de la production et purification de PqsC	31
	2.1.4	Production de HHQ in vitro	32
	2.1.5	Production de HHQ in vivo chez E. coli	33
	2.1.6	Production acellulaire de HHQ à partir du lysat d'E. coli	34
	2.1.7	Copurification de PqsB et PqsC et analyse enzymatique	35
	2.1.8	Mutagénèse dirigée sur le résidu Cys ₁₂₉ de PqsC	36
	2.1.9	Vérification <i>in vivo</i> de l'importance du résidu Cys ₁₂₉ de PqsC	37
	2.1.10	Isolement de PqsC	38
	2.2 Résu	mé	39
	2.3 Abstr	act	40
	2.4 Introd	duction	41
	2.5 Meth	ods	44
	2.5.1	Bacteria and plasmids	44
	2.5.2	Bacterial cultures	45
	2.5.3	Construction of <i>pqsC</i> -6xHis expression vector (pCD3)	45
	2.5.4	Construction of pqsB expression vector (pCD1)	46
	2.5.5	Construction of a pqsC-6xHis vector for P. aeruginosa expression (pCD4)	46
	2.5.6	Construction of pqsB-6xHis vector for P. aeruginosa expression (pCD2)	46

2.5.7	Site-directed mutagenesis of Cys ₁₂₉ in pqsC	47
2.5.8	Mass spectrometry	48
2.5.9	Isotope-labelled fatty acid feeding experiments	48
2.5.10	Supernatant cross-feeding experiments	48
2.5.11	Isotope-labelled acetate feeding experiments	49
2.5.12	Isolation of 2-ABA	49
2.5.13	Chemical synthesis of 2-ABA	50
2.5.14	HHQ production from malonyl-CoA and PA14 cell extract	50
2.5.15	Coexpression and purification of His-Tag-PqsB and PqsC-His-Tag	51
2.5.16	Proteomic analysis	52
2.5.17	In vitro synthesis of HHQ	52
2.6 Rest	ults	53
2.6.1	3-keto fatty acids are not precursors of HAQ	. 53
2.6.2	2-ABA is a precursor of HAQs	54
2.6.3	Biosynthesis of 2-ABA	56
2.6.4	Malonyl-CoA is a precursor of HHQ	57
2.6.5	Octanoic acid and PqsC are involved in the coupling of the aliphatic tail of	
	HHQ	58
2.7 Supp	plemental figures	61
2.8 Disc	ussion	63
2.9 Sign	ificance	68
2.10 AC	nowledgments	09
Conclusio	n et perspectives	70
Référence	S	72

Liste de figures

Figure 1.1. Schéma représentant le système de QS LuxI/LuxR chez V. fischeri 4
Figure 1.2. Structure chimique des auto-inducteurs produits dans les systèmes de QS LasI (3-oxo-C ₁₂ -HSL) et RhII (C ₄ -HSL)
Figure 1.3. Structure générale des HAQ 5
Figure 1.4. Structure chimique des HAQ les plus abondantes
Figure 1.5. Principales protéines impliquées dans la biosynthèse des HAQ chezPseudomonas aeruginosa7
Figure 1.6. Étapes du processus infectieux en fonction de la phase de croissance chez les bactéries à Gram négatif
Figure 1.7. Schéma représentant l'interdépendance des systèmes de QS chez Pseudomonas aeruginosa 10
Figure 1.8. Les composés précurseurs des HAQ proposés par Conforth et al., 1956 12
Figure 1.9. Schéma simplifié des deux voies métaboliques responsables de la synthèse de l'acide anthranilique pour la biosynthèse des HAQ chez <i>P. aeruginosa</i>
Figure 1.10. Schéma représentant les expériences de marquage effectuées par Bredenbruch (2005)
Figure 1.11. Spectres de masse montrant les résultats des expériences de marquage effectuées par Bredenbruch <i>et al.</i> , 2005
Figure 1.12. Réaction de synthèse du HHQ proposée par Bredenbruch (2005) 16
Figure 1.13. Réaction d'activation de l'anthranilate en anthranoyl-CoA catalysée par PqsA
Figure 1.14. Réaction de biosynthèse du DHQ 18
Figure 1.15. Schéma représentant l'expérience réalisée par le Dr. Déziel qui a amené à considérer l'existence d'un composé intermédiaire dans la voie de biosynthèse des HAQ
Figure 1.16. Schéma représentant l'expérience de marquage réalisée par le Dr. Dézielqui a amené à l'obtention d'un HHQ marqué

Figure 1.17. Schéma représentant l'expérience de marquage réalisée par le Dr. Déziel
et collaborateurs qui a amené à l'obtention du HHQ marqué dans le carbone 2 du
noyau quinoline et dans la chaîne aliphatique
Figure 4.40 Cohéme représentent l'expérience qui a amoné à l'abtention du 1810
Figure 1.18. Schema representant respendence qui a amene a robtention du HHQ
marqué au deutérium dans la queue aliphatique 22
Figure 1.19. Schéma expliquant la réaction qui a amené à l'obtention de HHQ avec une
masse additionnelle de 9 Da lors des expériences de marquage réalisées par
Bredenbruch (2005). D'après les résultats obtenus par le Dr. Déziel et collaborateurs . 23
Figure 1.20. Les trois blocs d'homologie identifiés chez PqsD, PqsC et PqsB et FabH.
Figure 2.1. Schéma représentatif des constructions pCD3 et pCD4 29
Figure 2.2. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-
PAGE) des fractions contenant la protéine PqsB avant (A) et après la purification (B) 30
Figure 2.3. Identification de la protéine PqsB purifiée à partir de la souche E. coli
Origami (DE3)
Eigure 2.4. Applying des fractions d'élution de Drac (de 40.5 kDs) lors de la surification
Figure 2.4. Analyse des fractions d'elution de PqsC (de 40,5 kDa) fors de la purfication
sur une colonne de d'affinite au nickel
Figure 2.5. Production de HHQ in vivo chez E. coli après l'induction avec l'IPTG en
présence du composé précurseur intermédiaire le 2-ABA
Figure 2.6. Production accllulaire de HHO è partir du lyset de la souche d'expression
E sell Origenti (DE2) des sultures réclisées à 45% et à 27%
E. coll Origami (DE3) des cultures realisées à 15°C et à 37°C
Figure 2.7. Des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)
montrant les protéines PqsB et PqsC coexprimées
Figure 2.8. Les enzymes PasB et PasC copurifiées par chromatographie d'affinité.
éluées à partir d'une concentration de 250 mM d'imidazole
Figure 2.9. Résultat de séquençage de PqsC mutée 37
Figure 2.10. Chromatogrammes montrant le pic correspondant au HHQ detecté dans
les surnageants
Figure 2.11. Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) montrant
le esélution des enzymes DasP et DasC lers de la surification per selenne de siskel 29
A COEIDIDO DES ENZANES FOSD EL FOSU IDIS DE lA DURINCANDO DAL COIDIDE DE DIDEEL - 30

Figure 2.12. Proposed pathway for the biosynthesis of 2-ABA, 2-AA, HHQ and HQNO.
Figure 2.13. Positive electrospray mass spectra of HHQ obtained after feeding P.aeruginosa with isotope-labelled precursors54
Figure 2.14. Supernatant cross-feeding experiments. Total HAQ production in the WT and in the supernatant (S) of nonpolar mutants of genes from <i>pqsABCDE</i> operon involved in HAQ synthesis
Figure 2.15. Positive electrospray spectra of HHQ produced by a double <i>pqsA- pqsH-</i> mutant fed with various culture supernatants providing 2-ABA
Figure 2.16. Malonyl-CoA and octanoyl-CoA are two precursors of HHQ 58
Figure 2.17. Polyacrylamide gels showing purified PqsB and PqsC
Supplemental Figure 2.12. Effect of dodecanoic acid addition on production of variousPseudomonas aeruginosa secondary metabolites62
Supplemental Figure 2.13. Negative electrospray MS/MS spectrum of 2-ABA purified
from <i>P. aeruginosa</i> culture supernatant

Liste des tableaux

Tableau 2.1. Bacterial strains used in this study	44
Tableau 2.2. Plasmids used in this study	45
Tableau 2.3. PCR primers	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

¹² C	Carbone-12
¹³ C	Carbone-13
D	Deutérium
2-ABA	2-aminobenzoylacétate
3-oxo-C12-HSL	N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone
Acétate (1,2-13C)	Acétate marqué avec carbone-13 dans les positions 1 et 2
Acétate (1-13C)	Acétate marqué avec carbone-13 dans la position 1
Acétate (2-13C)	Acétate marqué avec carbone-13 dans la position 2
ACP	Acyl-carrier-protein – Protéine porteuse d'acyle
AHL	Acyl homosérine lactone
C₄-HSL	Butanoyl homosérine lactone
CL/SM ou LC/MS	Appareil de chromatographie liquide relié à un spectromètre de
	masse
CoA	Coenzyme A
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DHQ	2,4,-dihydroxyquinoline
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
Fl	Fraction insoluble
FPLC	Fast protein liquid chromatography – Chrommatographie liquide
	rapide de protéines
FS	Fraction soluble
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinoline
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HNQ	4-hydroxy-2-nonylquinoline
HPLC	High performance liquid chromatography – Chromatographie en
	phase liquide à haute performance
HQNO	4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxyde
HSL	Homosérine lactone
IPTG	lsopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kDa	Kilodalton
kV	Kilovolts
LB	Lysogeny broth - Bouillon lysogène
litt.	Littérature
LuxR-AHL	Régulateur LuxR couplé avec un acyl homosérine lactone
m/z	Rapport masse sur charge
MASCOT	Logiciel conçu pour l'interprétation des donnés de spectrométrie
	de masse en identités de protéines
mp	Melting point – Point de fusion
MRM	Multiple Reaction Monitoring
np	non-polaire
N-terminal	Amino-terminal
O/N	Over night – Toute la nuit
OD ₆₀₀	Densité optique à une longueur d'onde de 600 nm
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction - Réaction en chaine de la polymérase
P _{lac}	Promoteur lactose
ppm	Parties par million
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal. (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline)
P _{T7}	Promoteur T ₇
QS	Quorum sensing
rpm	Rotations par minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis -
	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de
	dodécylsulfate sodique
SM/SM ou MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
TLC	Thin Layer Chromatography - Chromatographie en couche mince
TSB	Tryptic soy broth – Bouillon trypticase soja
V	Volts
Vfr	Virulence factor regulator – Regulateur global de l'expression de
	facteurs de virulence
VM	Volume mort

Mise en contexte

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, sous forme de bacille, mobile et aérobie. Cette bactérie appartient à la famille des y-protéobactéries. La présence de 5570 cadres de lecture ouverts prédits dans son génome est une indication de sa grande polyvalence et de sa diversité génétique (Stover et al., 2000). Le génome de P. aeruginosa contient un nombre très important de gènes prédits codant pour des protéines de la membrane externe impliquées dans l'adhésion, la motilité, l'efflux d'antibiotiques. l'exportation de facteurs de virulence et des récepteurs environnementaux, ainsi que de nombreux gènes codant pour des systèmes de transport et des enzymes impliquées dans l'absorption de nutriments et dans le métabolisme (Kung et al., 2010). En raison de sa versatilité métabolique, P. aeruginosa est une bactérie qui a des besoins nutritionnels minimes, pouvant obtenir de l'énergie à partir d'une variété de sources de carbone et pouvant utiliser l'azote comme accepteur final d'électrons sous des conditions anaérobies (Kung et al., 2010). Considérant son remarquable potentiel d'adaptabilité, il n'est pas surprenant de trouver P. aeruginosa dans une vaste diversité d'environnements naturels, notamment des milieux humides, où elle peut persister grâce à sa capacité à former des communautés bactériennes englobées dans une matrice adhésive et protectrice de polysaccharides. Ce mode de vie multicellulaire est nommé biofilm (Costerton et al., 1978). Les mêmes propriétés qui lui confèrent son succès adaptatif dans différentes niches écologiques lui permettent aussi de coloniser les plantes et les animaux où elle survit comme commensal, ou comme pathogène opportuniste causant des infections lorsque le système immunitaire de l'hôte est compromis. (Le Berre et al., 2006).

Grâce notamment à sa capacité de formation de biofilm et à sa résistance naturelle à de nombreux antiseptiques et antibiotiques, *P. aeruginosa* est souvent présente en milieu hospitalier où elle peut coloniser rapidement des instruments médicaux couramment utilisés comme des cathéters et des bronchoscopes, favorisant sa pénétration chez le patient et le développement d'infections nosocomiales (Brooun *et al.*, 2000). En conséquence, *P. aeruginosa* est souvent responsable d'infections respiratoires, urinaires et cutanées graves. Elle est également reconnue comme le principal agent causant des infections pulmonaires chroniques chez la plupart des

patients atteints de la fibrose kystique (Singh *et al.*, 2000; Winstanley *et al.*, 2009). Pour initier l'infection, *P. aeruginosa* utilise généralement un affaiblissement substantiel de la première ligne de défense de l'hôte, soit une altération de l'intégrité de la peau ou des muqueuses, ou bien, une altération des mécanismes de défense immunitaire à médiation cellulaire comme dans le cas de la neutropénie induite par chimiothérapie (Van Delden *et al.*, 1998). Une fois dans le site d'infection, *P. aeruginosa* déploie son « arsenal moléculaire », incluant de multiples facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires qui lui permettent de développer l'infection et de coloniser les divers tissus de l'hôte (Jimenez *et al.*, 2012). Ces facteurs de virulence sont exprimés de façon séquentielle lors des différentes étapes de l'infection de l'hôte (Van Delden *et al.*, 1998).

La première étape du processus infectieux consiste en l'adhérence de la bactérie dans l'épithélium altéré au moyen de l'expression de facteurs de virulence cellulaires, incluant le flagelle, le facteur d'adhésion (pili de type IV), l'alginate et les lipopolysaccharides de surface. Après la colonisation, le processus infectieux évolue, soit vers une phase d'infection chronique, ou bien, vers une phase d'infection aigüe. Cette dernière est caractérisée par une production majeure de facteurs de virulence extracellulaires dépendant de la signalisation cellulaire. Ces facteurs sont principalement les exotoxines, les exoprotéases, les phospholipases C et les chromophores. Ces facteurs de virulence endommagent sévèrement les tissus infectés et facilitent l'invasion du système sanguin et la dissémination bactérienne (Van Delden *et al.*, 1998).

L'expression de la plupart des facteurs de virulence extracellulaires requiert une coordination très stricte, notamment par des systèmes de régulation impliquant la signalisation cellulaire. L'ensemble de ces systèmes de régulation est connu comme « quorum sensing » (QS) (Jimenez *et al.*, 2012).

Le QS est un système de communication intercellulaire qui permet de réguler l'expression et/ou la répression coordonnée de gènes spécifiques en fonction de la densité de la population bactérienne (Fuqua *et al.*, 1994). Ce mécanisme de communication et de coopération cellulaire offre plusieurs avantages aux bactéries, comme l'adoption de comportements qui facilitent leur survie, leur protection et leur dissémination dans l'environnement. Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes de QS ont été identifiés, le système Las, le système Rhl et le système MvfR. Ces systèmes jouent tous

un rôle crucial dans la virulence de P. aeruginosa et dans la production du biofilm, un mécanisme de résistance rendant les traitements antibiotiques classiques moins efficaces. Il est donc impératif de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des infections causées par P. aeruginosa. Une nouvelle stratégie qui est envisagée serait d'utiliser des molécules visant à inhiber spécifiquement le QS. Chez P. aeruginosa, cette stratégie permettrait d'affecter sa pathogénicité sans altérer sa croissance. Étant donné que cela n'affecterait pas la viabilité cellulaire, le développement de résistance due à ces molécules serait moins favorisé (Hentzer et al., 2003). En effet, des études réalisées sur différents modèles animaux d'infection ont montré que les mutants du système de QS MvfR sont beaucoup moins virulents que la souche sauvage (Rahme et al., 1997; Mahajan-Miklos et al., 1999; Tan et al., 1999; Jander et al., 2000; Cao et al., 2001; Déziel et al., 2005). Toutefois, une meilleure compréhension du fonctionnement du système de QS MvfR et des enzymes responsables de la synthèse des molécules impliquées dans le QS est essentielle à cet égard et pourrait éventuellement ouvrir la voie à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et, par conséquent des antibiotiques plus spécifiques pour contrer les infections causées par P. aeruginosa.

Étude du rôle de PqsB et PqsC, des enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ chez *Pseudomonas aeruginosa.*

SYNTHÈSE

1 Le système de « quorum sensing » MvfR

1.1 Introduction

1.1.1 « Quorum sensing »

La communication cellulaire et les comportements cellulaires concertés sont maintenant acceptés comme étant courants chez la plupart des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Concevoir un mode de vie multicellulaire plutôt qu'individuel chez les bactéries a été possible grâce en grande partie à la découverte des molécules de signalisation et leur implication dans la perception de la densité cellulaire (Shapiro, 1998).

Le « quorum sensing » (QS) utilise de petites molécules diffusibles appelées autoinducteurs. Ces molécules sont synthétisées intracellulairement pendant la croissance bactérienne et sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles s'accumulent. Au fur et à mesure que la densité cellulaire locale augmente, la concentration des autoinducteurs augmente en parallèle. Une fois un seuil critique de concentration atteint, l'autoinducteur lie son récepteur à l'intérieur de la cellule, déclenchant une cascade de transduction de signal qui résulte en une activation et/ou répression de l'expression de gènes bien précis dans l'ensemble de la population. De cette façon, le QS conduit les cellules d'une population à adopter un comportement coopératif permettant leur adaptation aux changement des conditions environnementales (Galloway *et al.*, 2011). Le QS est impliqué dans la régulation de l'expression bactérienne, la symbiose, la motilité, la production d'antibiotiques, la sporulation et la formation de biofilms (Camilli *et al.*, 2006).

1.1.2 « Quorum sensing » chez les bactéries à Gram négatif

En général, chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes de QS sont organisés d'une façon semblable au système LuxI/LuxR caractéristique de la bactérie Vibrio fischeri (Figure 1.1). Les protéines de type LuxI sont des enzymes impliquées dans la synthèse d'acyl homosérine lactones (AHL) servant d'auto-inducteurs. Par ailleurs, différents homologues de LuxI génèrent

différentes molécules d'AHL (Greenberg, 2000). Spécifiquement, à faible densité cellulaire, l'opéron luxl est transcrit à un faible niveau basal. Par conséguent, l'autoinducteur est aussi produit à faible concentration et diffuse librement à travers la membrane cellulaire. La concentration extracellulaire de l'autoinducteur augmente simultanément et au même rythme qu'augmente la population cellulaire (Miller et al., 2001). Les protéines de type LuxR sont des régulateurs transcriptionnels. Les homologues de LuxR sont des enzymes constituées d'un domaine C-terminal responsable de la dimérisation et la liaison à l'ADN et un domaine Nterminal responsable de la liaison à l'autoinducteur (Parsek et al., 2000). Ainsi, lorsque la concentration critique de l'autoinducteur est atteinte, celui-ci lie le régulateur formant le complexe LuxR-AHL (Fugua et al., 1994). La forme active du complexe LuxR-AHL requiert la formation d'un homodimère. Ces interactions optimisent ainsi l'affinité du régulateur transcriptionnel à l'égard des régions promotrices des gènes cibles où le régulateur lie un domaine d'ADN spécifique et interagit aussi sur place avec l'ARN polymérase favorisant ainsi la transcription. La séquence d'ADN en question est la boîte lux, un palindrome de 20 paires de bases situé à environ -40 paires de bases du site d'initiation de la transcription du gène cible (Egland et al., 1999; Johnson et al., 2003).

L'expression de *luxl* est aussi stimulée par le complexe LuxR-AHL. De cette façon, lorsque le QS est activé la production de l'auto-inducteur est davantage induite et en conséquence sa concentration dans le milieu environnant devient encore plus importante, favorisant la formation d'une boucle d'auto-induction positive (Figure 1.1) (Galloway *et al.*, 2011).



Figure 1.1. Schéma représentant le système de QS LuxI/LuxR chez V. fischeri. Adapté de Galloway (2011).

1.1.3 « Quorum sensing » chez Pseudomonas aeruginosa

Plusieurs espèces bactériennes établissent un réseau de communication intercellulaire utilisant deux molécules de signalisation ou même plus, ou encore plusieurs systèmes de QS. Ceci est le cas de *P. aeruginosa*. Elle possède deux systèmes de QS utilisant des molécules de la famille AHL comme auto-inducteurs (Figure 1.2). Le système Las utilise la synthase LasI, un homologue de LuxI et responsable de la synthèse du 3-oxo dodécanoyl homosérine lactone (ou 3-oxo-C12-HSL). Le récepteur intracellulaire du 3-oxo-C12-HSL est le régulateur transcriptionnel LasR. Par ailleurs, le système RhI possède la synthase RhII responsable de la synthèse du butanoyl homosérine lactone (ou C4-HSL), qui lie le récepteur RhIR (Galloway *et al.*, 2011).



3-oxo-C₁₂-HSL

C₄-HSL

Figure 1.2. Structure chimique des auto-inducteurs produits dans les systèmes de QS Lasl (3-oxo-C₁₂-HSL) et RhII (C₄-HSL).

Ces deux systèmes de QS sont intégrés avec un troisième système, le système MvfR. Ce système utilise des molécules de signalisation chimiquement différentes des deux autres systèmes. Les molécules de signalisation du système MvfR appartient à la famille des 4hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) (Pesci *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2005) (Figure 1.3).



Figure 1.3. Structure générale des HAQ. Les HAQ sont des molécules hétérocycliques aromatiques composées d'un noyau quinoline avec une chaîne alkyle en position 2 (Wells, 1951).

Une fois le régulateur MvfR activé, il régule positivement l'expression des opérons *phn* et *pqs* qui codent pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse des HAQ (Figure 1.5) (Xiao *et al.*, 2006 a).

1.1.4 Le système MvfR

Le système MvfR est composé essentiellement d'un régulateur transcriptionel codé par le gène *mvfR* et deux opérons codant les enzymes nécessaires à la biosynthèse des HAQ. L'opéron *phnAB* code les sous-unités α et β de l'anthranilate synthase PhnAB, responsable de la biosynthèse de l'acide anthranilique, un précurseur direct des HAQ (Essar *et al.*, 1990).

L'opéron *pqsABCDE* code les enzymes PqsA, PqsB, PqsC, PqsD et PqsE. *In vivo*, les enzymes codées par cet opéron sont essentielles pour la biosynthèse des HAQ, à exception de PqsE qui semble être impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux facteurs de virulence contrôlés par le régulon *mvfR*, comme la pyocyanine, les rhamnolipides et les élastases (Gallagher *et al.*, 2002; Diggle *et al.*, 2003). Il est aussi possible que PqsE soit impliquée dans la régulation des systèmes MvfR et Rhl (Déziel *et al.*, 2005; Farrow *et al.*, 2008).

Plus de cinquante molécules appartenant à la famille des HAQ ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2004). Les HAQ les plus abondantes produites par *P. aeruginosa* sont celles qui portent une chaîne aliphatique à sept carbones, soient le HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline), le PQS (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, de l'anglais : *Pseudomonas* Quinolone Signal) et le HQNO (4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxyde) (Figure 1.4). Néanmoins, seulement le HHQ et le PQS sont connus comme auto-inducteurs dans le système MvfR (Lépine *et al.*, 2004).



Figure 1.4. Structure chimique des HAQ les plus abondantes.

Les HAQ ne sont pas toutes directement synthétisées par les enzymes codées par l'opéron *pqs* (Figure 1.5). La synthèse de PQS, et de HQNO nécessite des enzymes supplémentaires codées par des gènes positionnés ailleurs dans le génome. La production de PQS requiert l'enzyme PqsH, une monoxygénase FAD-dépendante qui catalyse l'hydroxylation du HHQ pour former du PQS (Gallagher *et al.*, 2002). Quant au HQNO, sa biosynthèse nécessite l'enzyme PqsL. Cette enzyme est une monoxygénase responsable de la modification du groupement azoté du noyau quinoline en *N*-oxyde (-NO) (Lépine *et al.*, 2004). Le HHQ n'est pas le précurseur intermédiaire du HQNO (Déziel *et al.*, 2004), le substrat de PqsL demeure encore inconnu.

La biosynthèse des HAQ requiert la présence du régulateur LasR puisque ce régulateur active directement la transcription de MvfR et régule également de manière positive l'expression

de pqsH. MvfR fait partie de la famille des régulateurs de type LysR. Cette famille partage une structure conservée portant un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN en position Nterminale, et un domaine de liaison du ligand en position C-terminale (Maddocks et al., 2008). Lorsque le régulateur MvfR lie son ligand, soit le HHQ ou bien le PQS, il subit un changement de conformation qui augmente l'affinité du domaine de liaison à l'ADN pour le promoteur présent dans des gènes qu'il régule (Wade et al., 2005). Cependant, MvfR possède une affinité plus importante pour le PQS que pour le HHQ (Xiao et al., 2006 b). Ceci suggère que la fixation de l'un ou l'autre ligand induirait un changement de conformation différent chez MvfR à l'égard d'une régulation sélective en fonction du ligand fixé. Lorsque MvfR est activé, il exerce une activation directe sur les opérons pqs et phn permettant ainsi la mise en place d'une boucle d'auto-induction positive qui favorise directement la production de HHQ. Quant à la production de PQS, elle n'est contrôlée qu'indirectement par MvfR, puisque celui-ci ne régule pas l'expression de pgsH (Déziel et al., 2005), le gène codant l'enzyme catalysant la conversion de HHQ en PQS. Par ailleurs, le circuit est régulé de manière négative par RhIR qui diminue la transcription de l'opéron pgsABCDE en se fixant sur des séquences spécifiques dans la région promotrice de l'opéron (McGrath et al., 2004; Xiao et al., 2006 a).



Figure 1.5. Principales protéines impliquées dans la biosynthèse des HAQ chez P. aeruginosa.

1.1.5 Hiérarchie des systèmes de « quorum sensing » chez *Pseudomonas* aeruginosa

Les systèmes de QS Las, RhI et MvfR coopèrent de manière dynamique et interviennent séquentiellement dans la régulation de l'expression des gènes codant des facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires de *P. aeruginosa*, qui sont ainsi exprimés différentiellement au cours des étapes précoces et tardives du processus infectieux (Figure 1.6) (Juhas *et al.*, 2005).

La cascade de QS chez *P. aeruginosa* débute avec l'activation de la transcription de *lasR* par Vfr (en anglais : *virulence factor regulator*), le régulateur majeur du QS chez cette bactérie (Pesci *et al.*, 1997). Vrf est apparenté au récepteur CRP (en anglais : cyclic AMP recepteur protein) (West *et al.*, 1994). Le facteur qui déclenche une augmentation de la concentration du second messager AMPc (adénosine monophosphate cyclique) chez *P. aeruginosa* n'est pas encore connu, mais il pourrait être bien un stimulus dépendant de la densité cellulaire vu que l'expression de *lasR* est aussi dépendante de cette condition. En effet, *lasR* est exprimé a niveau basal jusqu'à ce qu'il est induit dans la seconde moitié de la phase logarithmique et son expression devient maximale pendant la phase stationnaire (Pesci *et al.*, 1997). Lorsque Vfr est activé par l'AMPc, il lie une séquence consensus connue comme CCS (en anglais : CRP-binding concensus sequence) qui est présente dans la région promotrice de *lasR*, activant ainsi sa transcription (Albus A *et al.*, 1997). *IasR* possède un autre possible site transcriptionnels distinct, un palindrome de type boîte *lux* qui pourrait éventuellement être lié par LasR pour exercer un autre niveau de contrôle sur l'expression de *lasR*, ce qui pourrait expliquer les évidences d'autorégulation (Albus A *et al.*, 1997).



Figure 1.6. Étapes du processus infectieux en fonction de la phase de croissance chez les bactéries à Gram négatif. Adapté de Lautier et al., 2005.

L'activation de LasR comme régulateur transcriptionnel induit l'expression de plusieurs gènes codant des facteurs de virulence comme par exemple, la protéase LasA et l'exotoxine ToxA (Jones et al., 1993; De Kievit et al., 2000). Toutefois, il n'a pas encore été possible de définir une seule séquence consensus de liaison de LasR dans le région promotrice des gènes contrôlés par ce régulateur, suggérant que certains de ces gènes sont activés indirectement (Schuster et al., 2007). Parallèlement aux gènes de virulence, LasR active aussi la transcription de rhll et rhlR induisant ainsi l'expression du second système de QS (Latifi et al., 1996; Pesci et al., 1997, De Kievit et al., 2002). Cependant, étant donné que le système Rhl est inhibé en présence de 3-oxo-C12-HSL, il pourra s'activer seulement quand la concentration en LasR et 3oxo-C12-HSL aura diminué (Soberon-Chavez et al., 2005), permettant ainsi une activation séquentielle des deux systèmes. À son tour, RhIR module l'expression de plusieurs gènes comme lecA (lectine), ainsi que les opérons hcnABC, rhIAB et phzABCDEFG essentiels pour la production du cyanure d'hydrogène, des rhamnolipides et de la pyocyanine respectivement (Rasmussen et al., 2005). Toutefois, certains gènes de virulence sont contrôlés par les deux systèmes Las et Rhl, comme par exemple, les gènes encodant l'élastase LasB et la protéase alcaline AprA.

Le système de QS MvfR est interdépendant des systèmes Las et Rhl. En effet, la biosynthèse des HAQ est activée par le régulateur LasR, et régulée de façon négative par RhlR (Figure 1.7) (Gallagher *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006 b). Enfin, l'expression de plusieurs gènes de virulence est aussi modulée conjointement par les deux systèmes Rhl et MvfR.



Figure 1.7. Schéma représentant l'interdépendance des systèmes de QS chez Pseudomonas aeruginosa.

La découverte de la présence fréquente de mutants *lasR*⁻ dans l'environnement ainsi que chez les patients atteints des infections causées par *P. aeruginosa* est en opposition avec l'hypothèse qui considère le régulateur LasR comme étant essentiel pour activer pleinement la virulence chez cette bactérie. Ceci a fait l'objet d'études récentes afin de comprendre le rôle spécifique de LasR et son implication dans l'expression des facteurs de virulence. Dekimpe *et*

al. (2009) ont caractérisé l'expression de plusieurs gènes déterminants contrôlés par le QS chez un mutant *lasR*⁻. Leurs résultats ont montré que l'expression de plusieurs gènes contrôlés par les systèmes RhI et MvfR n'était pas inhibée, car le phénotype spécifique des gènes étudiés était observé pendant la phase stationnaire, indiquant plutôt une expression retardée. De plus, ils ont trouvé que le régulateur RhIR était capable d'activer l'expression des gènes régulés par LasR, incluant quelques gènes considérés exclusivement régulés par LasR comme *lasI*. Ils ont donc conclu qu' « en absence de LasR, un nouveau mécanisme est mis en place chez la bactérie pour contourner le défaut dans la régulation du QS, permettant à RhIR d'induire le système Las lorsque LasR n'est pas fonctionnel » (Dekimpe *et al.*, 2009). Il est très intéressant à cet égard de constater que le contrôle d'un système de QS sur un autre n'est donc pas absolu, mais que le contrôle des systèmes de QS est maintenu par des interactions complexes.

1.2 Biosynthèse des HAQ

En 1945, Hays (Hays *et al.*, 1945, cité par Wells, 1951) a rapporté l'isolement de cinq composés ayant des propriétés antibiotiques similaires provenant de *Pseudomonas aeruginosa.* Ces composés étaient insolubles dans l'eau mais solubles dans une variété de solvants organiques. Leur structure chimique était inconnue mais des analyses spectroscopiques avaient montré qu'ils étaient tous étroitement apparentés. Par manque d'une nomenclature appropriée, ces composés ont été nommés Pyo Ib, Pyo Ic, Pyo II, Pyo III, et Pyo IV selon leur ordre d'isolement. En 1951, Wells a determiné la structure chimique de trois de ces composés par absorption ultraviolet. En effet, il a demontré que les structures de Pyo Ib, Pyo Ic, et Pyo III correspondaient au 2-heptyl-4-quinolinol, 2-nonyl-4-quinolinol, et $2-(\Delta^1-nonenyl-)-4-quinolinol,$ respectivement (Wells, 1951).

Depuis la découverte de la structure chimique des composés Pyo, plusieurs études ont été effectuées afin d'élucider leur mécanisme de biosynthèse. En 1955, Cornforth a proposé que la biosynthèse de ces composés était possible par condensation de l'acide anthranilique avec un β-cétoacide provenant de la synthèse ou de la dégradation des acides gras, cette réaction conduirait à la synthèse directe d'un composé Pyo avec la perte d'une molécule de dioxyde de carbone et une molécule d'eau (Figure 1.8). Plus tard, cette hypothèse a pris de la consistance lorsque Déziel et collaborateurs (2004) ont démontré que l'acide anthranilique était le précurseur primaire de toutes les HAQ (Déziel *et al.*, 2004). En 2008, Zhang et collaborateurs

ont mis en évidence le rôle de PqsA, qui est en effet l'enzyme responsable de l'activation de



Figure 1.8. Les composés précurseurs des HAQ proposés par Cornforth et al., 1956.

1.2.1 Biosynthèse de l'acide anthranilique

Chez *P. aeruginosa*, l'approvisionnement en acide anthranilique utilisable pour la biosynthèse des HAQ provient de deux voies métaboliques distinctes (Figure 1.9). La première source correspond à la production directe de l'acide anthranilique par l'anthranilate PhnAB à partir de l'acide chorismique (Gallagher *et al.*, 2002). Bien que l'acide anthranilique soit aussi un métabolite intermédiaire dans la biosynthèse du tryptophane, l'anthranilate PhnAB n'intervient pas dans cette voie métabolique (Essar *et al.*, 1990). La deuxième source d'acide anthranilique provient de la dégradation enzymatique du tryptophane par la voie de la kynurénine. On considère généralement que cette voie serait davantage utilisée lorsque la bactérie pousse dans un milieu riche (Kurnasov *et al.*, 2003; Farrow *et al.*, 2007).



Figure 1.9. Schéma simplifié des deux voies métaboliques responsables de la synthèse de l'acide anthranilique pour la biosynthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. Adapté de Farrow (2007).

1.2.2 Les 3-cétoacides comme étant des précurseurs des HAQ

Les expériences élaborées par Bredenbruch et collaborateurs (2005) ont appuyé fortement l'hypothèse proposée par Confort (1956) selon laquelle les 3-cétoacides seraient des composés précurseurs des HAQ. L'objectif des expériences de Bredenbruch était de déterminer l'identité du substrat qui apportait les carbones 2 et 3 du noyau quinoline ainsi que la chaîne aliphatique. Bredenbruch avait considéré que le composé précurseur en question pourrait être synthétisé par condensations successives d'acétate au cours de la synthèse *de novo* des acides gras. Afin de déterminer la façon comme l'acétate pouvait s'intégrer dans le HHQ, Bredenbruch a effectué des expériences de marquage dans lesquelles il a cultivé *P. aeruginosa* dans un milieu minimal alimenté avec de l'acétate marqué au ¹³C comme source principale de carbone et de l'acide anthranilique non-marqué (Figure 1.10).



Extraction de HHQ au méthanol à partir du surnageant, séparation des HHQ par TLC, trimethylsilylation et analyse par CG/SM



Il a été observé en spectrométrie de masse que lorsque l'acétate était marqué dans le carbone 1, les HHQ produits portaient une masse de 320 Da, donc la masse était augmenté de 4 Da en comparaison du HHQ non-marqué ($M^* = 315$ Da) (Figure 1.11, a et b). Lorsque l'acétate était marqué dans le carbone 2, la masse des HHQ produits était augmentée de 5 Da (Figure 1.11, a et c). En fragmentant ces deux composés marqués, les auteurs ont d'observé l'ion fils 232 *m/z* provenant du marquage au carbone 1-¹³C et l'ion fils 233 *m/z* provenant du marquage au carbone 1-¹³C. Ces ions indiquaient la présence d'un carbone marqué dans le noyau quinoline des deux dérivés. Bredenbruch a donc proposé que la partie hétérocyclique du noyau quinoline pourrait aussi être synthétisée par des unités d'acétate. Ces évidences supportaient indirectement l'hypothèse proposé par Bredenbruch selon laquelle les HHQ seraient synthétisés par une condensation de Claisen entre le groupe carbonyle de l'acide anthranilique et le groupe ester d'un 3-cétodécanoïque.

Par ailleurs, l'alternance de ¹³C et ¹²C dans la chaîne alkyle et leur incorporation dans le noyau quinoline pourrait être expliquée en considérant que la biosynthèse des acides gras à partir de l'acétate 1-¹³C générait des acides carboxyliques marqués dans les carbones impairs tandis que les acides carboxyliques obtenus à partir de l'acétate 2-¹³C étaient marqués dans les carbones pairs.



Figure 1.11. Spectres de masse montrant les résultats des expériences de marquage effectuées par Bredenbruch (2005). Tiré de Bredenbruch et al., 2005.

Afin de démontrer que l'acétate était la source du précurseur acide 3-cétodecanoique, une expérience de marquage complet avec de l'acétate $(1,2^{-13}C)$ a été effectué (Figure 1.10). Si cette hypothèse était vraie, deux carbones ¹³C voisins devraient être détectés tout au long de la chaîne aliphatique ainsi que dans le noyau quinoline. Cette expérience a donné des HHQ avec une masse additionnelle de 9 Da, avec un double marquage au ¹³C dans le noyau quinoline. Puisque le composé précurseur suspecté comporte 10 carbones et le composé marqué obtenu en possède seulement 9, la perte d'un carbone pouvait seulement être expliqué par l'élimination d'une molécule de CO₂ provenant du groupe carboxyle du précurseur 3-cétodécanoïque lors de la réaction de condensation avec l'acide anthranilique (Figure 1.12). Donc, selon cette hypothèse, l'acide 3-cétodécanoïque est le précurseur à la fois de la chaine aliphatique et des carbones 2 et 3 du noyau quinoline.



Figure 1.12. Réaction de synthèse de HHQ proposée par Bredenbruch (2005).

1.2.3 Activation de l'acide anthranilique

L'utilisation de l'acide anthranilique dans la biosynthèse des HAQ requiert son activation et celle-ci a lieu au moyen de la formation d'un thioester avec le coenzyme A, cette réaction étant catalysée par l'enzyme PqsA, une acyl coenzyme A ligase (Figure 1.13) (Coleman *et al.*, 2008). Pour ce faire, PqsA catalyse la formation d'une liaison acyl-thiol entre la fonction carboxylique de l'anthranilate et la fonction thiol de la cystéamine terminale de la coenzyme A donnant l'anthranoyl-CoA. Cette liaison est riche en énergie et celle-ci est libérée lors de son hydrolyse favorisant la réalisation de la prochaine réaction (Bernhard, 1983).



100

Figure 1.13. Réaction d'activation de l'anthranilate en anthranoyl-CoA catalysée par PqsA. Adapté de Zhang (2008).

1.2.4 Biosynthèse de DHQ

Zhang et collaborateurs (2008) ont rapporté le mécanisme de biosynthèse du 2,4dihydroxyquinoline (DHQ), une molécule trouvée abondante dans le milieu dans la phase stationnaire chez *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2007). La réaction de biosynthèse est catalysée par PqsD, une enzyme de condensation de type FabH β -cétoacyl-ACP synthase III (Bera *et al.*, 2009). Le DHQ est composé d'un groupe anthranoyle condensé avec un groupe acétate. PqsD utilise comme substrats l'anthranoyl-CoA activé par PqsA, et le malonyl-CoA (ou malonyl-ACP) provenant de la synthèse *de novo* des acides gras. Dans la première étape de la réaction, le résidu cystéine 144 de PqsD lie l'anthranoyle pour former un composé intermédiaire connu comme anthranoyl-PqsD. Tel que mentionné plus haut, l'hydrolyse du lien thioester de l'anthranoyl-CoA fournit l'énergie nécessaire pour effectuer cette réaction. Lors de la seconde étape, l'enzyme acylée catalyse la condensation du carbone α du malonyle avec le groupe carboxylique de l'anthranoyle, libérant une molécule de CO₂, cette réaction conduisant à la formation du 2-aminobenzoylacétate Coenzyme-A (2-ABA-CoA). Il est considéré que ce composé intermédiaire se cyclise de façon spontanée pour former le DHQ (Figure 1.14) (Zhang *et al.*, 2008).



Figure 1.14. Réaction de biosynthèse de DHQ. Adapté de Zhang (2008).

La structure chimique du DHQ est très similaire à celle du HHQ. En effet, le DHQ est formé d'un noyau quinoline et possède deux groupements hydroxyles en position 2 et 4, à la différence que le HHQ possède une chaîne aliphatique à sept carbones en position 2 plutôt qu'un groupement hydroxyle (Lépine *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2008). La mise en évidence de cette réaction a donné d'autres indications sur la façon dont le noyau quinoline du HAQ pourrait se former. Le mécanisme serait donc plus compliqué que la proposition de Bredenbruch *et al.*, (2005).

1.2.5 Réévaluation de l'hypothèse du mécanisme de biosynthèse à une seule étape

Des expériences visant à étudier la façon dont les enzymes codées par l'opéron pqs interviennent dans la biosynthèse de HHQ chez la souche PA14 ont été effectuées dans le laboratoire du Dr. Déziel (Résultats non publiés). Dans une première expérience, le surnageant d'une culture d'un mutant pqsB ou pqsC a été donné à une culture d'un double mutant pqsA (incapable d'activer l'acide anthranilique), pqsH non-polaire (incapable de former PQS à partir de HHQ). Les deux mutants utilisés sont incapables de produire des HAQ lorsqu'ils sont cultivés séparément. Toutefois, lorsque la culture du double mutant pqsA ou pqsC, du HHQ a été détecté dans ce surnageant, démontrant qu'un surnageant d'un mutant pqsA ou pqsC possède un intermédiaire permettant la synthèse de HHQ chez un mutant pqsA non-polaire (Figure 1.15).



Figure 1.15. Schéma représentant l'expérience réalisée par le Dr. Déziel qui a amené à considérer l'existence d'un composé intermédiaire dans la voie de biosynthèse des HAQ.

Dans une deuxième expérience, un mutant *pqsC* non-polaire a été cultivé avec l'acétate complètement marqué avec le ¹³C comme la source principale de carbone et avec de l'acide anthranilique non-marqué et le surnageant de cette culture a été filtré et donné à une culture du double mutant *pqsA*, *pqsH* non-polaire. L'analyse ultérieure de ce surnageant a permis d'identifier la présence d'un HHQ avec une masse additionnelle de 1Da. (Figure 1.16).


Figure 1.16. Schéma représentant l'expérience de marquage réalisée par le Dr. Déziel qui a amené à l'obtention d'un HHQ marqué.

Si l'hypothèse de la biosynthèse des HAQ en une seule étape aurait été vraie, on aurait observé des HHQ produits avec une masse additionnelle de 9 Da tel qu'il a été observé par Bredenbruch *et al.*, (2005). Par contre, ce résultat a montré qu'un carbone du noyau quinoline provient d'un précurseur différent de celui de la chaîne aliphatique qui a été ajouté par le double mutant où les enzymes PqsB et PqsC sont fonctionnelles. Ceci indique que les enzymes PqsA et PqsD agissent de la même façon lors de la synthèse du noyau quinoline du HHQ et du DHQ pour produire un composé intermédiaire extracellulaire ayant incorporé une molécule originant de l'acétate et qui est utilisé par les enzymes PqsB et PqsC pour produire du HHQ.

Une autre expérience a été effectuée afin de vérifier cette hypothèse. Dans celle-ci, le surnageant d'un mutant *pqsC* non-polaire a été donné à une culture du double mutant *pqsA*, *pqsH* cultivé avec l'acétate marqué (1,2-¹³C). Le HHQ détecté était marqué dans la chaîne aliphatique avec une masse additionnelle de 8 Da (Figure 1.17).



Figure 1.17. Schéma représentant l'expérience de marquage réalisée par le Dr. Déziel et collaborateurs qui a amené à l'obtention du HHQ marqué dans le carbone 2 du noyau quinoline et dans la chaîne aliphatique.

Ce résultat confirme l'hypothèse de la biosynthèse des HAQ en deux étapes, dont la première implique l'incorporation dans le noyau quinoline d'un dérivé de l'acétate (comme le malonate) comme dans la biosynthèse du DHQ. Cette réaction serait catalysée par PqsD. La deuxième étape consisterait à l'incorporation de la chaîne aliphatique et d'un autre carbone au noyau quinoline, impliquant les enzymes PqsB et PqsC. Puisque le marquage était de 8 carbones, et que la queue aliphatique en comporte sept, cela indique que vraisemblablement c'est le carbone 2, adjacent à la queue aliphatique qui est marqué. Tout ces éléments nous amènent à conclure que le précurseur du carbone 3 du noyau quinoline est différent du précurseur de la chaîne aliphatique et donc que l'acide 3-cétodécanoïque n'est pas le précurseur du HHQ.

1.2.6 Réévaluation de l'hypothèse du précurseur 3-cétoacide

D'autres expériences ont été effectuées pour trouver un précurseur du HHQ autre que l'acide 3-cétodécanoïque. Le surnageant d'une culture du mutant PqsB non polaire (ou PqsC non polaire) a été donné a une culture de double mutant PqsA, PqsH non polaire alimentée avec l'acide dodécanoïque complètement marqué au deutérium. L'analyse du surnageant a permis de détecter du HHQ avec une chaîne aliphatique entièrement marqué au deutérium (Figure 1.18).



Figure 1.18. Schéma représentant l'expérience qui a amené à l'obtention du HHQ marqué au deutérium dans la queue aliphatique.

Le type de marquage utilisé ne permet cependant pas de savoir si les carbones en position 2 et 3 du noyau quinoline proviennent également de l'acide dodécanoïque utilisé. Cependant, le fait qu'une partie de l'acide dodécanoïque ait été incorporé en formant la chaîne aliphatique du HHQ soulève l'hypothèse que l'intermédiaire pourrait être un acide gras obtenu à travers la voie de la β-oxydation plutôt que par la synthèse *de novo* des acides gras. Dans cette expérience l'acide dodécanoïque aurait subit un premier cycle de β-oxydation produisant un intermédiaire avec 10 carbones, le décanoyl-CoA, qui serait incorporé aux HAQ donnant un analogue du HHQ ayant une queue aliphatique à 9 carbones, le 4-hydroxy-2-nonylquinoline (HNQ). De la même façon, à partir du décanoyl-CoA un deuxième cycle de β-oxydation aurait produit un intermédiaire à 8 carbones, l'octanoyl-CoA, qui serait incorporé au HHQ en formant la queue aliphatique à 7 carbones. Afin de vérifier cette hypothèse, de l'acide octanoïque deutéré a été ajouté dans une culture de PA14. Les résultats ont montré que le HHQ détecté présentait un marquage important de +15 Da. Ceci supporte l'hypothèse que de l'acide octanoïque exogène est bien incorporé dans le HHQ.

Ces résultats peuvent aussi expliquer les résultats obtenus par Bredenbruch (2005) lors de leurs expériences de marquage (Figure 1.19).



Figure 1.19. Schéma expliquant la réaction qui a amené à l'obtention de HHQ avec une masse additionnelle de 9Da lors des expériences de marquage réalisées par Bredenbruch (2005). D'après les résultats obtenus par le Dr. Déziel et collaborateurs.

Comme l'acétate marqué (¹³C) était la source principale de carbone dans la culture de *P. aeruginosa*, le malonyl-CoA et l'acide octanoïque, obtenu via la synthèse *de novo* des acides gras ou par β-oxydation de l'acide décanoïque, étaient marqués au ¹³C. Par ailleurs, l'acide anthranilique non-marqué additionné dans la culture aurait été activé en anthranoyl-CoA par l'enzyme PqsA. Tout comme dans la biosynthèse de DHQ, l'anthranoyl-CoA aurait été transformé en anthranoyl-PqsD. Une réaction de condensation entre le malonate marqué et l'anthranoyl-PqsD non-marqué aurait formé le composé intermédiaire 2-aminobenzoylacetate coenzyme A (2-ABA-CoA) doublement marqué. Suite à une decarboxylation du 2-ABA, un seul ¹³C aurait subsité et la condensation subséquente avec le dérivé octanoyl-CoA marqué, aurait permis l'incorporation complète de celui-ci en formant le carbone 2 du noyau quinoline et la queue aliphatique du HHQ. Cette séquence expliquerait l'obtention du HHQ +9 Da qui a été détecté par Bredenbruch et collaborateurs (2005).

1.2.7 Rôle de PqsB et PqsC

Dans la biosynthèse des acides gras, les acyl-CoA sont condensés par des enzymes de type cétoacyl-ACP synthétases III ou bien par des protéines de la famille FabH. Afin d'attribuer un potentiel de condensation chez PqsB, PqsC et PqsD qui sont des enzymes codées par l'opéron *pqs*, Zhang (2008) a comparé les séquences d'acides aminés de ces protéines avec celle de l'enzyme FabH d'*E. coli.* L'alignement multiple des séquences a montré une similarité importante avec FabH. En effet, les trois enzymes possèdent trois blocs d'homologie aux alentours du site actif de FabH, lequel est composé par une triade de résidus Cys, His et Asn considérés tous essentiels pour la catalyse (Davies *et al.*, 2000) (Figure 1.20).



Figure 1.20. Les trois blocs d'homologie identifiés chez PqsD, PqsC et PqsB et FabH. Figure tirée de Zhang (2008).

Parmi les trois enzymes, PqsD est la plus apparentée à FabH et possède tous les trois résidus prédits dans le site actif. En effet, il a été démontré que son résidu Cys₁₄₄ est le responsable de la liaison avec l'anthranoyle lors de la biosynthèse du DHQ (Zhang *et al.*, 2008). Chez PqsC, seulement les deux premiers résidus Cys et His sont conservés, tandis que chez PqsB tous les trois résidus du site actif sont absents ce qui pourrait indiquer que cette enzyme n'est pas une enzyme de condensation. Les évidences présentées suggèrent que PqsC serait donc la candidate le plus probable pour le transport de l'octanoyle et sa condensation avec le composé intermédiaire lors de la synthèse du HHQ.

1.3 Hypothèse

La biosynthèse des HAQ est un mécanisme à deux étapes. Dans la première étape, PqsA active l'acide anthranilique en anthranoyl-CoA, par la suite PqsD lie l'anthranoyle et catalyse la condensation de celui-ci avec le précurseur malonyl-CoA. Cette réaction de condensation permet la formation d'un composé intermédiaire, le 2-ABA. Dans la deuxième étape de la synthèse, PqsC lie l'octanoyle et le transporte dans la réaction de condensation avec le 2-ABA qui est catalysé par PqsB pour former le HHQ.

1.4 Objectif du projet

1.4.1 Objectif général

Le volet principal de ce projet porte sur l'étude du rôle des enzymes PqsB et PqsC dans la biosynthèse des HAQ chez *P. aeruginosa*. Ce projet prétend comprendre le mécanisme de formation du noyau quinoline et l'ajout de la queue aliphatique des HAQ en étudiant les interactions entre les enzymes PqsB, PqsC et les composés précurseurs suspects, soient le 2-ABA et l'octanoyle. À plus long terme, ce projet vise également à fournir une approche pour étudier *in vitro* l'efficacité de certains inhibiteurs potentiels de la synthèse des HAQ et du QS chez *P. aeruginosa*.

1.4.2 Objectifs spécifiques

- Production et purification des enzymes PqsB et PqsC afin d'étudier leur rôle in vitro.
- Identification de l'enzyme responsable du transport du groupe acyle précurseur du carbone 2 et de la chaîne aliphatique des HAQ.
- Identification du résidu responsable de la fixation du groupe acyle précurseur par mutagénèse dirigée.

- Vérification de l'implication du résidu fixant le groupe acyle précurseur sur la production des HAQ *in vivo*.
- Reproduire *in vitro* la deuxième étape de la biosynthèse des HAQ à partir des composés précurseurs et les deux enzymes qui sont impliquées.

Étude du rôle de PqsB et PqsC, des enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ chez *Pseudomonas aeruginosa*.

ARTICLE

2 Article

<u>Titre</u>

The end of an old hypothesis: the *Pseudomonas* quorum sensing signalling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines are derived from fatty acids, not 3-ketofatty acids.

<u>Auteurs</u>

Carlos Eduardo Dulcey¹, Valérie Dekimpe¹, David-Alexandre Fauvelle, Sylvain Milot, Marie-Christine Groleau, Nicolas Doucet, Laurence G. Rahme, François Lépine² and Eric Déziel².

¹These authors contributed equally. ²Corresponding authors: francois.lepine@iaf.inrs.ca and eric.deziel@iaf.inrs.ca

Running title

Pseudomonas 4-quinolones derive from fatty acids.

<u>Journal</u>

Chemistry and Biology.

État actuel:

In press as: Dulcey *et al.*, The End of an Old Hypothesis: The Pseudomonas Signaling Molecules 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines Derive from Fatty Acids, Not 3-Ketofatty Acids, Chemistry & Biology (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.021

2.1 Contribution

Mon travail de recherche a contribué à la réalisation de cet article au moyen des expériences qui sont présentes ci-dessous.

2.1.1 Construction des vecteurs d'expression 6xHis- pqsC (pCD3 et pCD4)

L'enzyme PqsC a été produite sous forme recombinante au moyen du système d'expression T7. Pour ce faire, le gène pqsC a été cloné dans le plasmide pET28a avec une étiquette 6xHis en position N-terminale pour faciliter sa purification par chromatographie d'affinité (Vecteur pCD3). Afin de vérifier la fonctionnalité de l'enzyme 6xHis-PqsC, la région RBS-6xHis-*pqsC* du plasmide pCD3 a été sous-clonée dans le plasmide navette pDN19 (Vecteur pCD4) (Figure 2.1). Ce vecteur a été par la suite utilisé pour complémenter un mutant PA14 $\Delta pqsC$ non-polaire et la production de HHQ en milieu liquide a été vérifiée par chromatographie liquide couplée avec spectrométrie de masse.



Figure 2.1. Schéma représentatif des constructions pCD3 et pCD4.

2.1.2 Optimisation de la production et purification de PqsB

L'enzyme PqsB a été produite au moyen de la construction pET303-*pqsB*-6xHis (pMSR1) fournie par L.G. Rahme. La production d'une protéine fonctionnelle PqsB-6xHis a été préalablement vérifiée *in vivo* par complémentation d'un mutant PA14Δ*pqsB* non-polaire via le plasmide navette pDN19-6xHis-*pqsB* (pCD2). Pendant son expression chez la souche *E. coli* BL21(DE3) la formation de corps d'inclusion s'est avérée toujours problématique. Pour contrer ce problème une optimisation des conditions d'expression a été nécessaire. En diminuant la température de croissance et le niveau de production, un repliement correct de la protéine semble avoir été obtenu car 60% de la protéine recombinante PqsB a été trouvée dans la fraction cytoplasmique lorsque la production a été réalisée chez la souche *E. coli* Origami (DE3) à une concentration de 0.1 mM d'IPTG et une température de 15°C pendant 18h d'incubation sous agitation (Figure 2.2A). À partir de la fraction soluble obtenue, la protéine recombinante a été purifiée par chromatographie d'affinité avec une colonne de nickel (Figure 2.2B).



Figure 2.2. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des fractions contenant la protéine PqsB avant (A) et après la purification (B). A- Fractions obtenues lors de l'optimisation des conditions d'expression de PqsB. FS est la fraction soluble (cytoplasmique); FI est la fraction insoluble (corps d'inclusion). B- Fractions d'élution obtenues lors de la purification de PqsB sur une colonne de d'affinité au nickel. La flèche pointe les bandes qui correspondent à la protéine recombinante de 31.8 kDa; M est le marqueur de polds moléculaire; VM est la fraction correspondant au volume mort.

La figure 2.3 montre le résultat d'analyse protéomique qui a permis de confirmer l'identité de la protéine PqsB purifiée. Parmi les peptides détectés aucun ne présentait une masse additionnelle correspondant à celle du précurseur octanoyle.



Figure 2.3. Identification de la protéine PqsB purifiée à partir de la souche *E. coli* Origami (DE3). Les séquences en rouge correspondent aux peptides identifiées (69%) par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine de la protéine présente dans une bande provenant d'un gel de polyacrylamide. Un résultat de 746 indique une très forte probabilité que cette identification ne soit pas dûe au hasard.

2.1.3 Optimisation de la production et purification de PqsC

Lors de plusieurs tentatives d'expression de *pqsC* chez *E. coli* BL21 (DE3) via le vecteur d'expression pCD3, la protéine recombinante a été toujours détectée dans la fraction non-soluble formant des agrégats non fonctionnels. Même la variation de paramètres comme la température, le niveau de production et la souche d'expression, qui avait donnée des résultats encourageants dans le cas d'expression de *pqsB*, n'a pas été suffisante pour minimiser l'agrégation *in vivo* de PqsC.

Dans une autre approche pour la rendre soluble, via le repliement *in vitro*, les corps d'inclusion ont été isolés par centrifugation après la lyse cellulaire. Ensuite une dénaturation chimique complète de la protéine a été réalisée avec la guanidine et en présence du glutathion réduit comme agent réducteur. Enfin, l'agent dénaturant a été éliminé par forte dilution dans une solution de renaturation contenant du glutathion oxydé et de l'arginine, celle-ci diminuant l'agrégation des protéines en inhibant leurs interactions intermoléculaires. Une fois la protéine repliée, la réaction a été arrêtée en diminuant le pH de 8.5 à 5 et le produit a été concentré d'environ 10 fois et le tampon a été changé par dialyse. Avant la purification par

chromatographie d'affinité, la protéine non-repliée ou bien agrégée ainsi que l'arginine ont été éliminés par centrifugation. La figure 2.4 montre clairement que la protéine a été rendue soluble lorsqu'elle a été repliée *in vitro*.



Figure 2.4. Analyse des fractions d'élution de PqsC (de 40.5 kDa) lors de la purification sur une colonne de d'affinité au nickel. A- Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE. B- Analyse par immunobuvardage de type western. M est le marqueur de poids moléculaire; C- est la fraction correspondant au volume mort qui a été utilisé comme contrôle négatif; C+ correspond l'enzyme PqsC provenant directement des corps d'inclusion qui a été utilisée comme contrôle positif.

L'analyse protéomique a permis de confirmer l'identité de la protéine PqsC purifiée, toutefois aucun peptide ayant une masse additionnelle correspondant à celle du précurseur octanoyle a été détecté.

2.1.4 Production de HHQ in vitro

Afin de confirmer *in vitro* l'implication de PqsB et PqsC dans la deuxième étape de biosynthèse de HAQ, les composés précurseurs suspects, soient le 2-ABA et l'octanoyl-CoA ainsi que les deux protéines purifiées ont été mis en réaction. Ce test enzymatique n'a pas permis la production de HHQ même en utilisant une méthode de détection de spectrométrie de masse très sensible comme le MRM (en anglais : *multiple reaction monitoring*).

2.1.5 Production de HHQ in vivo chez E. coli

Afin d'éliminer le doute qui subsistait quant à la fonctionnalité de l'enzyme PqsC repliée *in vitro*, les plasmides d'expression pMSR1 codant pour l'enzyme PqsB et pCD3 codant l'enzyme PqsC ont été transformés chez la souche *E. coli* Origami (DE3). La culture en milieu liquide a été induite à l'IPTG en présence du 2-ABA, celui-ci extrait et purifié à partir du double mutant *pqsB pqsH*. Ensuite la présence de HHQ dans le surnageant a été vérifiée par spectrométrie de masse. La figure 2.5 montre des résultats encourageants confirmant que les enzymes recombinantes PqsB et PqsC sont produites de façon fonctionnelle lorsqu'elles sont co-exprimées chez *E coli*.



Figure 2.5. Production de HHQ *in vivo* chez *E. coli* après l'induction avec l'IPTG en présence du composé précurseur intermédiaire le 2-ABA.

2.1.6 Production acellulaire de HHQ à partir du lysat d'E. coli

Afin de vérifier si les protéines co-exprimées étaient toujours fonctionnelles après la lyse cellulaire, des tests enzymatiques ont été effectués à partir des lysats cellulaires obtenus à différents temps d'induction de la souche d'expression à l'IPTG. Les précurseurs 2-ABA et octanoyl-CoA ont été ajoutés au lysat et la production de HHQ a été analysée par spectrométrie de masse. Afin de vérifier l'effet de la température d'induction sur la solubilité des protéines co-exprimées, des lysats provenant des cultures induites à 15°C et 37°C ont été comparés. Afin de vérifier si la co-expression avait un effet positif sur le repliement des protéines, la fraction cytoplasmique a été séparée du lysat cellulaire et analysée en parallèle (Figure 2.6).



Figure 2.6. Production acellulaire de HHQ à partir du lysat de la souche d'expression *E. coli* Origami (DE3) des cultures réalisées à 15°C et à 37°C.

Ces résultats confirment que les enzymes co-exprimées conservent leur fonctionnalité après la lyse cellulaire. L'activité enzymatique détectée dans la fraction soluble a confirmé que la co-expression avait effectivement favorisée le repliement de PqsB et PqsC, la figure 2.7 a permis de confirmer la présence de ces deux protéines dans la fraction cytoplasmique. La coexpression de PqsB et PqsC a été donc observée comme une approche avantageuse afin de simplifier les étapes de production et purification de ces deux enzymes.



Figure 2.7. Des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) montrant les protéines PqsB et PqsC co-exprimées. A- Les fractions solubles obtenues à différentes temps d'induction. B- Les protéines dans les fractions non-solubles. M est le marquer de poids moléculaire.

2.1.7 Co-purification de PqsB et PqsC et analyse enzymatique

Les enzymes PqsB et PqsC ont été co-purifiées par chromatographie d'affinité à partir de la fraction soluble du lysat cellulaire (Figure 2.8). Afin de vérifier leur fonctionnalité après les étapes de purification on a reproduit avec succès la deuxième étape de la voie de biosynthèse de HHQ *in vitro* à partir des composés précurseurs et les enzymes co-purifiées (voir section 2.6.5 de l'article). En effet, lors de l'analyse peptidique de la protéine PqsC co-purifiée, un peptide a été observé avec une masse additionnelle correspondant a un résidu octanoyle ce qui indique qu'elle est impliquée au moins dans le transport de l'octanoyle nécessaire à la biosynthèse de HHQ (Ces résultats sont montrés en détail dans la section 2.6.5 de l'article).



Figure 2.8. Les enzymes PqsB et PqsC co-purifiées par chromatographie d'affinité, éluées à partir d'une concentration de 250 mM d'imidazole. M est le marqueur de poids moléculaire.

2.1.8 Mutagénèse dirigée sur le résidu Cys₁₂₉ de PqsC

Afin de vérifier si le résidu Cys₁₂₉ était le responsable du transport de l'octanoyle dans la réaction de condensation avec le 2-ABA, ce résidu a été changé par une alanine via la mutagènese dirigée. Cette mutation a été vérifiée par séquençage (Figure 2.9). Cette protéine mutée a aussi été object d'une analyse peptidique qui a été comparée avec celui de la protéine native (ces résultats sont montrés en détail dans la section 2.6.5 de l'article).

1	MHKVKLAAIT	CELPARSYEN	DDPVFAAVPD	LSESWWQFWG	VNRRGYFDPR
51	NGENEFSLVV	RAAERLLRSS	DTAPDSVDML	ICSASSPIMT	DAGDVLPDLR
101	GRLYPRMANV	LSKQLGLSRA	LPLDSOMEAA	SFLLNLRLAA	SMIRQGKAEK
151	VLVVCSEYIS	NLLDFTSRTS	TLFADGCAVA	LLTRGDDDSC	DLLASAEHSD
201	ATFYEVATGR	WRLPENPTGE	AKPRLYFSLF	SDGQNKMASF	VPTNVPIAMR
251	RALEKAGLGS	DDIDYFVFHQ	PAPFLVKAWA	EGIGARPEQY	QLTMGDTGVM
301	ISVSIPYTLM	TGLREGKIRP	GDRIVMAGAA	TGWGFAAQVW	QLGEVLVCX

Figure 2.9. Résultat de séquençage de PqsC mutée. Un 81% des peptides ont été détectés (en rouge). La flèche pointe sur le résidu Ala qui maintenant à la place du résidu Cys 129.

2.1.9 Vérification in vivo de l'importance du résidu Cys₁₂₉ de PqsC

Un mutant PA14 $\Delta pqsC$ non polaire a été complémenté avec le plasmide portant le gène *pqsC* muté portant le residue Ala₁₂₉ à la place du residue Cys₁₂₉. La production de HHQ a été comparé chez le mutant non complémenté, le mutant complémenté avec le gène *pqsC* natif et le mutant complémenté avec le gène *pqsC* muté (Figure 2.10).



Figure 2.10. Chromatogrammes montrant le pic correspondant au HHQ detecté dans les surnageants : A- Le mutant non complementé. B- Le mutant complementé avec *pqsC* muté. C- Le mutant complementé avec *pqsC* natif. D- Le standard interne indiquant le temps de retention du HHQ.

2.1.10 Isolement de PqsC

Afin d'isoler la protéine PqsC sous forme soluble, considérant l'approche de la coexpression avec PqsB, un plasmide d'expression pCD1 qui permet l'expression de *pqsB* sans l'étiquette d'histidine a été construit. De cette façon, lors de la purification par chrommatographie d'affinité, seulement la protéine PqsC ayant son étiquette 6xHis pouvait être retenue dans la colonne de nickel. La figure 2.11 montre les résultats de la purification où les deux protéines ont été cependant co-eluées à une faible concentration d'imidazole.



Figure 2.11. Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) montrant la coélution des enzymes PqsB et PqsC lors de la purification par colonne de nickel. M est le marqueur de poids moléculaire; VM est le volume mort.

2.2 Résumé

Plusieurs groupes de bactéries pathogènes utilisent de petites molécules de signalisation diffusibles pour réguler leur virulence d'une manière concertée. *Pseudomonas aeruginosa* utilise le HHQ et le PQS qui font partie de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), comme molécules de signalisation. Nous avons démontré que l'acide octanoïque est directement incorporé dans le HHQ. Ce résultat élimine l'hypothèse formulée depuis plus de soixante ans qui postulait que les 3-cétoacides étaient les précurseurs des HAQ. Nous avons trouvé que la voie de biosynthèse des HAQ est un mécanisme qui comporte deux étapes. Premièrement, l'enzyme PqsD catalyse la biosynthèse du 2-aminobenzoylacetate (2-ABA) à partir de l'anthranoyl-CoA et le malonyl-CoA. Deuxièment, dans une réaction de decarboxylation le 2-ABA condense avec le groupe octanoate lié à PqsC donnant le HHQ. Celui-ci, est le précurseur direct de PQS. PqsB est étroitement associé avec PqsC et est requise dans la deuxième étape. Cette découverte offre une alternative prometteuse concernant le développement des médicaments anti-virulence spécifiques pour combattre ce pathogène opportuniste, pour lequel on a besoin d'alternatives aux traitements anti-infectieux traditionnels.

2.3 Abstract

Groups of pathogenic bacteria employ diffusible signals to regulate their virulence in a concerted manner. *Pseudomonas aeruginosa* uses 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), including HHQ and PQS, as unique signals. We demonstrate that octanoic acid is directly incorporated into HHQ. This finding rules out the long-standing hypothesis that 3-ketofatty acids are the precursors of HAQs. We found that HAQ biosynthesis, which requires the PqsABCD enzymes, proceeds by a two-step pathway: [1] PqsD mediates the synthesis of 2-aminobenzoylacetate (2-ABA) from anthranoyl-CoA and malonyl-CoA, then [2] the decarboxylating coupling of 2-ABA to an octanoate group linked to PqsC produces HHQ, the direct precursor of PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal). PqsB is tightly associated with PqsC and required for the second step. This finding uncovers promising targets for the development of specific antivirulence drugs to combat this opportunistic pathogen.

Highlights

- 1- We have deciphered the 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) biosynthetic pathway.
- 2- Contrary to the current model, fatty acids are directly incorporated into HAQs.
- 3- PqsD produces 2-aminobenzoylacetate (2-ABA), which is then coupled to a fatty acid by PqsC.
- 4- 2-ABA is also likely the precursor of HQNO and 2-aminoacetophenone.

2.4 Introduction

The bacterium Pseudomonas aeruginosa is a Gram negative opportunistic pathogen frequently responsible for infections among immunocompromised individuals and is also often involved in hospital-acquired infections (Driscoll et al., 2007; Kerr et al., 2009). Furthermore, it is the leading cause of morbidity and mortality in people affected with the genetic disease cystic fibrosis. Most virulence factors expressed by this bacterium are controlled in a cell densitydependent manner by a process called "quorum sensing" (QS), where cells communicate via small diffusible signalling molecules (Jimenez et al., 2012). There are three QS systems in P. aeruginosa, controlled by the transcriptional regulators LasR, RhIR and MvfR (PgsR) (Balasubramanian et al., 2013). In the two former systems, a cognate autoinducer synthase produces the signalling molecules N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) and N-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL), respectively (Smith et al., 2003; Juhas et al., 2005). Each signal binds to its corresponding transcriptional regulator, thus activating the transcription of various downstream targets, including its synthase gene. Since production of many virulence determinants in pathogenic bacteria requires a fully functional « quorum sensing » circuitry, cell-to-cell communication represents an intensely investigated promising target as an alternative to antibiotics in virulence control (Bjarnsholt et al., 2010; Galloway et al., 2012).

In the *P. aeruginosa* MvfR system, the signalling molecules belong to a family of compounds that share a 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HAQ) structure, such as 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (PQS), its direct precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and 4-hydroxy-2-heptylquinoline-*N*-oxide (HQNO) (Fig. 2.12) (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004). HAQs are also called 2-alkyl-4(1*H*)-quinolones (Heeb *et al.*, 2011). PQS and HHQ are both able to bind MvfR (Wade *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006; Diggle *et al.*, 2007). Upon binding to its ligand, MvfR induces the expression of the *pqsABCDE* operon, which is responsible for the biosynthesis of HAQs (Gallagher *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2004). *In vivo*, all of the enzymes encoded by this operon are essential for HAQ synthesis except for PqsE, which seems to be specifically involved in the expression of the numerous virulence factors controlled by the MvfR régulon (Diggle *et al.*, 2003; Déziel *et al.*, 2007; Farrow *et al.*, 2008). Two other metabolites, 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ) (Lépine *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008) and 2-aminoacetophenone (2-AA) (Kesarwani *et al.*, 2001) are also co-produced with HAQs (Fig. 2.12), but they only require the activity of PqsA and PqsD.

Molecules produced from the activity of the *pqsABCD* gene products display additional biological activities besides MvfR activation. For instance, HHQ, PQS and 2-AA can modulate the innate immune response of mammalian hosts (Kim *et al.*, 2010; Bandyopadhaya *et al.*, 2012), while HQNO inhibits various cytochromes and decreases the antibacterial activity of aminoglycoside antibiotics towards Gram-positive bacteria (Lightbown 1954; Hoffman *et al.*, 2006). Of note, methylated analogs of HAQs are also produced in various *Burkholderia* species, and their production depends on an operon containing genes highly similar to those of *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008).

Inhibition of the MvfR regulon by mutational inactivation of *mvfR*, *pqsE* or *pqsA* decreases *P. aeruginosa* virulence in a mouse acute infection model (Cao *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2005). Furthermore, hindering HAQ synthesis protects mice from the infection (Lesic *et al.*, 2007), which confirms that HAQ biosynthesis is a promising target to control virulence of this bacterium. However, the HAQ biosynthetic pathway is only partially deciphered.

We know that anthranilic acid is a precursor of HAQs (Calfee *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2004), and that it is activated into anthraniloyl-CoA by PqsA. The generally accepted model states that the quinoline ring of HAQs originates from a one-step head-to-tail condensation of 3-ketofatty acids with anthranilic acid (Heeb *et al.*, 2011). This hypothesis was initially proposed as early as in 1956 when the structure of HAQs was first uncovered (Cornforth *et al.*, 1956). This was later given more credit by Luckner and Ritter (Luckner *et al.*, 1965; Ritter *et al.*, 1971) and by Bredenbruch *et al.* (Bredenbruch *et al.*, 2005).The roles of PqsB, PqsC and PqsD in the biosynthesis of HAQs are still unknown.

In addition to the enzymes encoded *pqsABCDE*, the biosynthesis of HQNO and the other members of the *N*-oxides family requires the monoxygenase encoded by *pqsL* (Déziel *et al.*, 2004; Lépine *et al.*, 2004). The substrate of PqsL is unknown, but we have shown that HHQ is not the precursor of HQNO (Déziel *et al.*, 2004). While the biosynthesis of 2-AA has not been solved, the biosynthesis of DHQ is better understood. *In vitro* studies revealed that PqsD binds to anthraniloyl-CoA and catalyses a reaction with malonyl-CoA to produce a hypothetical CoA-activated 2-aminobenzoylacetate (2-ABA-CoA) intermediate, which would spontaneously form DHQ (Fig. 2.12) (Zhang *et al.*, 2008).



Figure 2.12. Proposed pathway for the biosynthesis of 2-ABA, 2-AA, HHQ and HQNO. The * and + symbols refer to the source of the carbon as originating from the carbon 1 and 2 of acetate, respectively. Pathway in the box corresponds to the biosynthesis of DHQ as published by Zhang *et al.*, 2008. AA, anthranilic acid; 2-ABA, 2-aminobenzoylacetate; 2-AA, 2-aminoacetophenone; HHQ, 4-hydroxy-2-heptylquinoline; HQNO, 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxide; DHQ, 2,4-dihydroxyquinoline; PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal), 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline.

We have elucidated the function for PqsB, PqsC and PqsD in the biosynthesis of HAQs, and determined that the current model involving 3-ketofatty acids as precursors is incorrect. We present evidence that the actual precursors are fatty acids that can be produced through β -oxidation of longer chain fatty acids and that the other precursor is 2-aminobenzoylacetate produced by the action of anthraniloyl-PqsD and malonyl-CoA.

2.5 Methods

2.5.1 Bacteria and plasmids

The wildtype bacterium was *P. aeruginosa* strain PA14 (Lee *et al.*, 2006). Bacteria and plasmids are presented in tables 2.1 and 2.2, respectively.

Strains	Characteristics	References	
P. aeruginosa/Lab #			
PA14/ED14	Clinical isolate UCBPP-PA14	47	
PA14 pqsA ⁻ np/ED83	Unmarked pqsA deletion	L.G. Rahme	
PA14 pqsB ⁻ /ED117	pqsB::TnphoA	48	
PA14 pqsC ⁻ np/ED218	Nonpolar pqsC::Kan	49	
PA14 pqsD ⁻ np/ED690	Nonpolar pqsD::Kan	L.G. Rahme	
PA14 pqsA ⁻ pqsH/ED170	pqsA ⁻ np, pqsH::aacC1	L.G. Rahme	
PA14 pqsB ⁻ pqsL ⁻ /ED1156	ΔpqsL, pqsB::ISIacZ	This study	
E. coli DH5a	supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Invitrogen	
<i>E. coli</i> Origami 2 (DE3)	D(ara-leu)7697 DlacX74 DphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+ laclq pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (StrR, TetR)	Novagen	
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lacl::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	Novagen	

Table 2.1. Bacterial strains used in this study.

Vectors	Characteristics	Source
pET22b(+)	P _{T7} , <i>lacO</i> , MCS, 6xHis-Tag, <i>bla</i> , <i>lacl</i>	Novagen
pET28a	P _{T7} , <i>lacO</i> , MCS, 6xHis·Tag, <i>lacl,</i> Kan ^R	Novagen
pGEM [®] -T easy	PSP6 RNA polymerase, IacO, bla, PT7, phage f1 region	Promega
pDN19	P _{lac} , P _{T7} , <i>lacZα', tetA</i> , <i>oriT</i>	50
pMSR1	P _{T7} , <i>lacO, pqsB-</i> 6xHis·Tag, <i>bla, lacl,</i> (from pET303)	L.G. Rahme
pCD1	pqsB cloned in pET22b(+)	This study
pCD2	pqsB-6xHis·Tag from pMRS1 cloned in pDN19	This study
pCD3	6xHis·Tag-pqsC built into pET28a	This study
pCD4	6xHis·Tag-pqsC from pCD3 cloned in pDN19	This study

Table 2.2 Plasmids used in this study.

2.5.2 Bacterial cultures

Tryptic soy broth (TSB; BD) was used for all cultures, unless otherwise stated. Bacteria were grown at 37°C in a TC-7 roller drum (New Brunswick) or on TSB agar plates. Cultures are typically performed at least in triplicates.

2.5.3 Construction of pqsC-6xHis expression vector pCD3

The *pqsC* coding sequence was amplified from PA14 genomic DNA as template with a Fast-Pfu DNA polymerase (Feldan) using primers F-pqsC-NdeI and R-pqsC-EcoRI (See table 2.3). The PCR product was purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), and sequentially digested with NdeI and EcoRI (NEB). In parallel, pET28a was similarly digested in similar conditions. Ligation reaction was carried out with the T4 DNA ligase (NEB), and transformation performed on chemically competent *E. coli* DH5 α cells. Transformed cells were

selected on LB agar plates containing 30 µg/mL kanamycin. After incubation at 37°C overnight, recombinant transformed clones were confirmed by colony PCR.

2.5.4 Construction of *pqsB* expression vector (pCD1)

In order to produce a not-tagged PqsB expression vector, reverse primer R-pqsB-HindII was designed with a stop codon. Forward primer was F-pqsB-NdeI (See table 2.3). Construction of pCD1 was performed according to the method described above for pCD3.

2.5.5 Construction of a pqsC-6xHis vector for P. aeruginosa expression (pCD4)

pCD3 was digested using both Xbal and EcoRI restriction enzymes. The 6xHis-tag-*pqsC* fragment was separated after agarose gel electrophoresis and purified. Plasmid pDN19 was linearized using Xbal and EcoRI, and purified. The fragment was ligated in linearized pDN19 as above. Transformation in chemically competent *E. coli* DH5α was carried out and transformed cells were selected on LB agar plates containing 20 µg/mL tetracycline and after incubation at 37°C positive clones were verified by colony PCR. Functional expression of PqsC was confirmed by complementation of a nonpolar *pqsC*- mutant and HAQ detection by LC/MS (see below).

2.5.6 Construction of pqsB-6xHis vector for P. aeruginosa expression (pCD2)

pMSR1 was used as a template to PCR amplify the *pqsB*-6xHis fragment, using primers F-pqsB-Xbal and R-pqsBHisTag-SacI (See table 2.3). After purification, the PCR product was cloned into the linearized plasmid pGEM[®]-T Easy according to the method described by Promega, and then transformed in *E. coli* DH5α. This subclone was purified using the Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega) and digested with Xbal and SacI (NEB). The *pqsB*-6xHis-tag fragment was separated on agarose gel electrophoresis and purified. In parallel, pDN19 was digested with the same enzymes and purified. Subsequently, ligation was performed with T4 DNA ligase. Transformants in *E. coli* DH5α were selected on LB agar plates containing 20

µg/mL tetracycline. Functional expression of PqsB was confirmed by complementation of a nonpolar *pqsB*- mutant and HAQ detection by LC/MS.

2.5.7 Site-directed mutagenesis of Cys₁₂₉ in pqsC

To examine if the Cys 129 residue of PqsC is required for binding octanoyl, this residue was changed to an alanine by QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Wang, W. Y. & Malcolm., 1999). We used plasmid pCD3 as template primers PqsC_C129A and PqsC_C129A-Antisense (See table 2.3). The PCR was carried out using the Fast-Pfu DNA polymerase. After purification of the product, this methylated template was digested with DpnI (NEB[®]) and the mutated construction was transformed in *E. coli* BL21 (DE3) chemical competent cells. Site-directed mutagenesis was verified by sequencing the *pqsC* gene on the mutated plasmid.

Name	Sequence (Sequence that hybridizes with DNA template is highlighted)
F-PqsC-Ndel	5'ACACACCATCATATGCATAAGGTCAAACTGGC 3'
R-PqsC-EcoRI	5' ACACACCATGAATTCAGCAACAGGTCGATGTCCTC 3'
F-PqsB-Xbal	5' GACTTCTAGAATGTTGATTCAGGCTGTGGG 3'
R-PqsBHisTag-Sacl	5' GAGCTCTTTGTTAGCAGCCGGATCTC 3'
F-PqsB-Ndel	5' ACACACACATATGTTGATTCAGGCTGTGGG 3'
R-PqsB-Hindll	5' ACACACAAAAGCTTCTATTATGCATGAGCTTCTCCCG 3'
PqsC_C129A	5' GATTCGCAGATGGAGGCCGCCAGCTTCCTGCT 3'
PqsC_C129A-Antisense	5' AGCAGGAAGCTGGCGGCCTCCATCTGCGAATC 3'

Table 2.3. PCR primers.

2.5.8 Mass spectrometry

The mass spectrometer was a triple quadrupole Quattro Premier XE (Waters, Missisissauga, Can.) interfaced to a Waters 2795 HPLC. The column was a 4.6 x 250 mm Agilent XDB-C8 column (particle size, 5 μ m). The mobile phase was composed of water and acetonitrile containing 1% acetic acid. Quantification of the various HAQ was performed using HHQ-d₄ as internal standard, as described previously (Lépine *et al.*, 2003; Lépine *et al.*, 2011).

The mass spectrometer was operated in positive electrospray ionization mode with a capillary voltage of 3 kV and a cone voltage of 20 V. Nitrogen was the nebulising gas and the source was held at 120°C. Scanning was performed in full scan mode with a mass range of m/z 130 to 400 in negative mode, 2 mM ammonium acetate was included in the water and acetonitrile mobile phases. MS/MS analysis was performed with Argon as collision gas.

2.5.9 Isotope-labelled fatty acid feeding experiments

Decanoic-9,9,10,10,10-d5 acid (CDN isotopes, Pointe-Claire, Canada) and decanoic-1,2-¹³C₂ acid (Sigma) stocks were prepared in MeOH at a final concentration of 100 mM. Overnight cultures of *P. aeruginosa* PA14 were diluted in fresh TSB to an OD₆₀₀ = 0.5. Cultures were supplemented with 1 mM of the desired labeled fatty acid and 50 mg/L anthranilic acid and grown at 37°C with rotation. Control cultures were also prepared by replacing the labeled molecules with MeOH or with unlabeled decanoic acid (Sigma). Samples were collected at OD₆₀₀ = 2.5 and analyzed for HHQ production.

2.5.10 Supernatant cross-feeding experiments

Supernatant from overnight cultures of various *P. aeruginosa* mutants supplemented with PQS-d4 (20 mg/l 2,3,4,5-tetradeuterated PQS) were collected by centrifugation and filtration (0.22 um). Supernatant-based medium was then prepared as follows : 2 mL of filtered supernatant, 0.5 mL of sterile water and 0.5 mL of 6X TSB broth. An overnight culture of a second mutant (see Fig. 2.14) was diluted in prepared supernatant-based medium to an OD_{600} =

0.5 and cultures were grown at 37°C. Samples were treated as usual for LC/MS quantification of HAQs, except that HHQ-d4 was used as internal standard.

2.5.11 Isotope-labelled acetate feeding experiments

To further investigate the biosynthesis of 2-ABA, the nonpolar $pqsB^{-}pqsL^{-}$ double mutant, was cultivated in an M9 mineral medium with 20 mg/L PQS as inducer, 36 mM sodium acetate-¹³C-labelled at position 1 or 2, (Sigma-Aldrich), or unlabelled acetate, as sole carbon source, and 50 mg/L anthranilic acid to avoid incorporation of ¹³C labelling in the aromatic ring. Sterile supernatants were recovered by centrifugation and filtration and provided to the nonpolar *pqsA- pqsH-* double mutant growing in TSB, as described above for the cross-feeding experiments. For experiments shown in figures 2.15c and 2.15d, the 2-ABA present in the precultures was not labelled, and therefore the sodium acetate-1,2-¹³C or the fully ¹³C-labelled octanoic acid was provided to the *pqsA- pqsH-* mutant cultures along with supernatants.

2.5.12 Isolation of 2-ABA

Twenty 250 mL Erlenmeyer flasks each containing 50 mL of TSB supplemented with 20 mg/l of PQS were inoculated with a nonpolar *pqsB⁻ pqsL⁻* mutant and incubated at 34°C and 240 rpm in a rotary shaker for 18 h. The supernatant of a nonpolar *pqsB⁻ pqsL⁻* double mutant produces more HHQ when fed to a nonpolar *pqsA*- mutant than the single non polar *pqsB* mutant (result not shown) and is thus ideal to maximize the production of the intermediate. The cultures were then pooled and centrifuged at 14000 x *g* for 15 min. The supernatant was extracted twice with 600 mL ethyl acetate and once with 600 mL dichloromethane. The aqueous phase, which still contained the active intermediate, was concentrated to 50 mL in a rotary evaporator and 50 mL of methanol was added. After leaving the mixture at 4°C for 1 h, it was filtrated and the filtrate evaporated to a volume of 30 mL. A volume of 50 mL of ethanol was then added, the precipitate removed by filtration and the filtrate evaporated to dryness. The residue was then fractionated with a Waters DeltaPrep 4000 preparative HPLC, equipped with a 50 x 21 mm Gemini NX-C18 column (particle size, 10 µm) (Phenomenex). Water (A) and acetonitrile (B), each containing 3 mM NH₄OH, were used as eluents, with a flow rate of 3.5 mL·min⁻¹. The initial gradient was 100% A for 9 min, then going to 20% B in 2 min, then to 100% B in 1 min, which

was then maintained for 7 min. The absorbance was monitored at 364 nm and the active fraction, identified by feeding cultures of a nonpolar $pqsA^-$ mutant and looking for HHQ production, eluted between 7 and 9.7 min. The solvent was evaporated and the residue further purified by thick layer chromatography on a 20 x 20 cm Partisil PK6F silica plates (Whatman) using methanol/ethyl acetate (1:1) as eluent. The plates were revealed with UV light and the band with a Rf = 0.55 was collected.

2.5.13 Chemical synthesis of 2-ABA

2-ABA was chemically synthesized by hydrolysing ethyl 2-nitrobenzoylacetate with sulphuric acid and by hydrogenation of the acid with palladium, as described (Sicker *et al.*, 1988). Exactly 240 mg ethyl-2-nitrobenzoylacetate were dissolved in 1 mL water to which was added 500 μ L concentrated sulphuric acid and left at room temperature overnight. The mixture was poured on ice and extracted with ethyl acetate. The organic phase was then extracted with a 1% Na₂CO₃ aqueous solution which was acidified to pH 4-5. This solution was extracted with ethyl acetate to provide 167 mg of pure 2-nitrobenzoylacetic acid (mp = 118-119°C, litt. mp = 117°C) (Overmyer 1926). 2-nitrobenzoylacetic acid (200 mg) were dissolved in 10 mL isopropanol, and 50 μ L of concentrated ammonium hydroxide and 10 mg of 5% palladium on charcoal were added. The mixture was hydrogenated at 25 psi for 1.5 h. After filtration the solvent was evaporated and the residue purified par thick layer chromatography to produce 140 mg 2-ABA.

The synthesis of 2-aminobenzoylacetate- $1,2^{-13}C_2$ was also performed starting with ethyl acetoacetate- $1,2^{-13}C_2$ and 2-nitrobenzoyl chloride to produce ethyl 2-nitrobenzoylacetoacetate which upon treatment with pure sulphuric acid produced 2-nitrobenzoylacetic acid which was hydrogenated as above.

2.5.14 HHQ production from malonyl-CoA and PA14 cell extract

The PA14 cell lysate was prepared as follows: Bacteria grown at $OD_{600} = 4$ were recovered by centrifugation at 4000 x g for 30 min at 4°C and washed twice in PBS. The cells were concentrated 10x in 20 mM Tris-HCl pH 7.6 buffer, and lyzed by three cycles of 30 sec

sonication on ice with 1 min intervals (Branson sonifier 450, Duty cycle : 30%, Output control : 10). Finally, the insoluble fraction was removed by centrifugation at 15000 x g for 30 min at 4°C and the cytoplasmic extract retrieved by filtration of the supernatant on 0.2 μ m.

Increasing concentrations of malonyl-CoA (0-10 μ M), were mixed with 100 μ M anthranilic-d4 acid, 100 μ M Coenzyme A, 650 μ M ATP, and 100 μ M octanoyl-CoA, in a volume of 90 μ L completed with 50 μ L of the soluble PA14 cytoplasmic extract. The reaction was incubated for 1 h at 37°C, and the production of HHQ-d4 was measured by LC/MS, using 4-hydroxy-3-methyl-2-heptenylquinoline as internal standard (Vial *et al.*, 2008). The assay was performed in duplicate.

2.5.15 Co-expression and co-purification of His Tag-PqsB and PqsC-His Tag

Plasmids pMSR1 and pCD3 were transformed in *E. coli* Origami 2 (DE3) and possible double transformants selected on LB agar plates containing 30 µg/mL kanamycin, and 50 µg/mL carbenicilline. Presence of both plasmids was confirmed by colony PCR. A positive clone was grown O/N in LB with 30 µg/mL kanamycin, and 50 µg/mL carbenicilline and diluted 1/100 in 500 mL LB. When the OD₆₀₀ reached 0.8, expression was induced with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 h and the cells were then collected by centrifugation at 4000 x *g* for 30 min at 4°C. The pelleted cells were then resuspended in 35 mL cold binding buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazole, pH 7.8) and lyzed by five cycles of 1 min sonication on ice with 1 min intervals (Branson sonifier 450, Duty cycle : 30%, Output control : 10). Finally, the insoluble fraction was removed by centrifugation at 15000 x *g* for 30 min at 4°C and the soluble extract retrieved by filtration of the supernatant on 0.2 µm.

Co-purification of the tagged PqsB and PqsC proteins was performed using a 5 mL HisTrap FF affinity column (GE Healthcare) prepared according to the manufacturer's instructions, and an ÄKTApurifier FPLC (GE Healthcare). A flow of 1 mL/min was used throughout the purification steps. After the samples were loaded, the column was washed with five column volumes of binding buffer. For elution, buffer A was the same as binding buffer without imidazole, while buffer B contained 0.5 M imidazole. An increasing imidazole gradient was achieved by going from 4% buffer B to 60% buffer B over 20 column volumes. Two mL samples of flow-through and fractions were collected and analyzed on a 12% SDS-PAGE gel.

Fractions containing the co-purified proteins were pooled, and the elution buffer was changed by dialysis with a 10 kDa cut-off dialysis bag over 80 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 at 4°C. Dialyzed proteins were then concentrated about 100x using an Amicon Ultra-15 centrifugal filter with a 10 kDa cut-off (Millipore). When the volume was reduced to about 500 µl, an equal volume of 2X conservation buffer (20 mM HEPES, 60% glycerol, pH 8.0) was added and aliquots were conserved at -80°C. We used the Bradford protein assay (BioRad) to measure the concentration of the co-purified PqsB/PqsC proteins.

2.5.16 Proteomic analysis

Co-purified PqsB and PqsC was separated from the protein mixture by running on SDS-PAGE 12% acrylamide gel. Both PqsB and PqsC bands were cut from the gel. Proteins were reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with trypsin. The tryptic peptides were eluted from the gel with acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid. The tryptic peptides were then separated on a Agilent Nanopump using a C18 ZORBAX trap and a SB-C18 ZORBAX 300 reversed phase column (150 mm x 75 µm, 3.5 µm particle size) (Agilent Technologies, Inc.). All mass spectra were recorded on a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer (Q-Trap, AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments, California, USA) equipped with a nano-electrospray ionization source. The accumulation of MS/MS data was performed with the Analyst Software, version 1.4 (AB Applied Biosystems / MDS SCIEX Instruments, California, USA). MASCOT (Matrix Science, London, UK) was used to create peak lists from MS and MS/MS raw data.

2.5.17 In vitro synthesis of HHQ

For the enzymatic assay, 0 to 27.5 μ M octanoyl-CoA, 100 μ M 2-ABA, and 20 ng/ μ L of copurified PqsB/PqsC were combined and completed to 100 μ L with 20 mM Tris-HCl pH 7.6. The reaction was incubated for 1 h at 37°C, and the production of HHQ was measured by LC/MS, using 4-hydroxy-3-methyl-2-heptenylquinoline as internal standard (Vial *et al.*, 2008). The assay was performed in duplicate.

2.6 Results

2.6.1 3-keto fatty acids are not precursors of HAQs

We were intrigued by a recent paper showing that adding 1 mM dodecanoic acid to a *P. aeruginosa* culture leads to increased production of pyocyanin, a virulence factor controlled by the MvfR régulon (Kwan *et al.*, 2011). They hypothesized that this increased pyocyanin production was due to an increase in the production of 3-oxo-C₁₂-HSL because of an increased production of its precursor 3-ketododecanoic acid through β -oxidation of dodecanoic acid (Kwan *et al.*, 2011). We repeated this experiment using our *P. aeruginosa* PA14 to which was added the same concentration of dodecanoic acid and we similarly obtained an increase in pyocyanin (Supplemental Fig. 2.12a). While the level of 3-oxo-C₁₂-HSL was not significantly increased by the fatty acid, HAQ production was consistently elevated (Supplemental Figs. 2.12b and 2.12c), an indication that the fatty acid increased the production of an HAQ precursor. Thus, to verify if a fatty acid could be directly incorporated into the structure of HHQ, 1 mM decanoic-9,9,10,10,10- d_5 acid was provided to a PA14 culture. Under these conditions, HHQ was labelled at 75% with five deuterium (Fig. 2.13a), showing that this fatty acid was incorporated within this HAQ.

As the generally accepted precursors of HAQs are 3-ketofatty acids, this labelled decanoic acid should have undergone first β -oxidation into 3-ketodecanoic acid before reacting with anthranilic acid, followed by concurrent loss of the acid function (as CO₂) to produce HHQ. We tested the recognized model by adding 1 mM decanoic-1,2- $^{13}C_2$ acid to a PA14 culture. β -oxidation of this compound should produce 3-oxodecanoic-1,2- $^{13}C_2$ acid which, taking into account the loss of the acid function (as CO₂) should produce HHQ labelled with only one ^{13}C . The extent of this ¹³C labelling should match the 75% level of labelling obtained when decanoic-9,9,10,10,10- d_5 acid was provided to the cultures. However, the relative proportion of the m/z 245 over 244 was only 21% (Fig. 2.13b), very close to the theoretical value of 19% (due to the natural abundance of ¹³C), clearly indicating that 3-ketodecanoic acid cannot be a direct precursor of HHQ.



Figure 2.13. Positive electrospray mass spectra of HHQ obtained after feeding *P. aeruginosa* with isotopelabelled precursors. Addition of (a) 1 mM decanoic-9,9,10,10,10- d_5 acid, or b) 1 mM decanoic-1,2-¹³C₂ acid to a *P. aeruginosa* PA14 culture in TSB.

2.6.2 2-ABA is a precursor of HAQs

To test the hypothesis that the quinoline ring of HAQs might be the result of a two-step process involving an intermediate that can be isolated, we performed a series of cross-feeding experiments with various nonpolar mutants of the *pqsABCDE* operon involved in HAQ synthesis. In these mutants, the genes in the operon downstream from the inactivated gene are still transcribed. To maintain a WT level of expression of the other enzymes in the operon, we always included in all the cultures the MvfR-inducing ligand PQS, in its 2,3,4,5-tetradeuterated form (PQS-d4) to prevent interference with LC/MS quantification (Lépine *et al.*, 2003). As a first step, we confirmed that none of the *pqsA*, *pqsB*, *pqsC* and *pqsD* mutant produces measurable amounts of HAQs (Fig. 2.14, on the right). Then, we fed the filter-sterilized supernatant of these *pqs* mutants to another *pqs* mutant and looked for the production of HAQs. Figure 2.14 shows that only the supernatant of a *pqsB*- or *pqsC*- mutant, when provided to a *pqsA*- or *pqsD*-

mutant, results in HAQ production. This indicates that the culture supernatant of a nonpolar *pqsB*- or *pqsC*- mutant must contain an intermediate in the biosynthesis of HAQs.

The active intermediate was purified by activity-guided fractionation using preparative HPLC and thick layer chromatography, and ultimately identified by MS and MS/MS as 2-ABA. Negative electrospray ionization LC/MS/MS presents a pseudomolecular ion at m/z 178 and fragments at m/z 134 (loss of CO_2) and 92 (loss of C_2H_2O), as expected (Supplemental Fig. 2.13). Once purified, this compound is relatively unstable and decomposes in a matter of hours on standing at room temperature in water. 2-AA and DHQ are among the degradation products, the latter being predominantly produced under acidic conditions.

To conclusively prove the structure of the intermediate, 2-ABA was chemically synthesized (see METHODS). Like the compound obtained from purification, synthetic 2-ABA is relatively unstable in solution, but in a dry form can be stored for extended period of time at - 20°C. When the synthetic product was fed to a double nonpolar *pqsA- pqsH-* mutant (unable to produce 2-ABA and to convert HHQ into PQS), 2-AA, HHQ and HQNO were produced. This mutant was used rather than a *pqsA-* mutant to avoid further transformation of HHQ into PQS, in order to simplify the analysis and increase HHQ concentration.

The synthesis of 2-aminobenzoylacetate- $1,2^{-13}C_2$ was also achieved. When it was fed to the nonpolar *pqsA- pqsH*- mutant, the 2-AA, HHQ and HQNO produced were totally labelled with only one ¹³C, as expected.


Figure 2.14. Supernatant cross-feeding experiments. Total HAQ production in the WT and in the supernatant (S) of nonpolar mutants of genes from *pqsABCDE* operon involved in HAQ synthesis. In a second step (B) the supernatants of each mutant were added to cultures of all the other nonpolar mutants.

2.6.3 Biosynthesis of 2-ABA

To further investigate the biosynthesis of 2-ABA, the double nonpolar *pqsB⁻ pqsL⁻* mutant, an overproducer of 2-ABA, was cultivated in a mineral medium with acetate ¹³C-labelled at position 1 or 2 as sole carbon source, supplemented with anthranilic acid to avoid incorporation of ¹³C labelling in the aromatic ring and PQS-d4 as inducer. The resulting supernatant was then added to a culture of the *pqsA- pqsH-* mutant in TSB. When the sole carbon source was acetate labelled at position 1, the pseudomolecular ion of the HHQ produced

was predominantly not labelled (Fig. 2.15a). But when acetate was labelled at position 2, the HHQ produced appeared exclusively at m/z 245 showing that it had incorporated one 13 C (Fig. 2.15b).



Figure 2.15. Positive electrospray spectra of HHQ produced by a double pqsA- pqsH- mutant fed with various culture supernatants providing 2-ABA. When a double $pqsB^{-}pqsL^{-}$ mutant was cultivated in M9 mineral medium with (a) acetate labelled at position 1 or (b) at position 2 with ¹³C as carbon source and the supernatant added to a nonpolar pqsA- pqsH- mutant culture in TSB. (c) $pqsB^{-}pqsL^{-}$ mutant cultivated in M9 medium with unlabelled acetate and the supernatant fed to a double pqsA- pqsH- mutant mutant grown in fully ¹³C acetate, (d) supernatant of a pqsC- mutant cultivated in TSB and fed to a pqsA- pqsH- mutant grown in TSB and supplemented with fully ¹³C-labelled octanoic acid.

2.6.4 Malonyl-CoA is a precursor of HHQ

Because acetyl-CoA is a precursor of malonyl-CoA *in vivo*, and considering the published role of malonyl-CoA in the biosynthesis of DHQ, we wondered whether malonyl-CoA could also be involved in the biosynthesis of HHQ. To test this hypothesis, a PA14 cytoplasmic extract was combined with 1,2,3,4-tetradeuteroanthranilic acid (anthranilic-d₄ acid), CoA, octanoyl-CoA (see below) and increasing levels of malonyl-CoA; the HHQ-d₄ produced was monitored by LC/MS. Figure 2.16a shows that no HHQ-d₄ is produced in absence of malonyl-CoA, while increasing the

amount of malonyl-CoA leads to a corresponding augmentation in HHQ-d₄, thus validating the hypothesis.



Figure 2.16. Malonyl-CoA and octanoyl-CoA are two precursors of HHQ. (a) Dose-response relationship between added malonyl-CoA and HHQ-d₄ production of a cytoplasmic extract of PA14 fed anthranilic acid-d₄, CoA, and octanoyl-CoA. (b) Dose-response relationship between added octanoyl-CoA and *in vitro* HHQ production when co-purified His-tagged PqsC and PqsB are provided with 2-ABA.

2.6.5 Octanoic acid and PqsC are involved in the coupling of the aliphatic tail of HHQ

To identify the precursor incorporated in the aliphatic tail of HAQs, the nonpolar *pqsB⁻ pqsL⁻* mutant was cultured in TSB and the supernatant fed to the nonpolar *pqsA- pqsH-* mutant growing in mineral medium containing fully ¹³C-labelled acetate. The pseudomolecular ion of the HHQ produced showed an increase of 8 Da (Fig. 2.15c). This suggested that these eight

carbons originating from acetate would come from octanoic acid produced from *de novo* fatty acid synthesis. To confirm this hypothesis, the supernatant of a nonpolar *pqsC*- mutant was provided to the nonpolar *pqsA*- *pqsH*- mutant fed with fully ¹³C-labelled octanoic acid instead of acetate, and the HHQ produced showed the same mass increase of 8 Da (Fig. 2.15d). These results identify octanoic acid as a direct precursor of HHQ.

Because of the amino acid sequence homologies between PqsC and PqsD, which performs the condensation of anthraniloyl-CoA with malonyl-CoA for the biosynthesis of DHQ (Zhang et al., 2008), we then decided to purify PqsC in order to study its potential role in the biosynthesis of HHQ. When trying to overexpress an His-tagged PqsC construct in E. coli strains BL21 or Origami under various temperature or IPTG concentrations, we always observed the protein inactive in inclusion bodies. Attempts to denature/renature the protein failed. However when co-expressed with a His-tagged PgsB construct, PgsC was found in the cytoplasmic fraction. After gel electrophoresis, the band corresponding to the molecular weight of PgsC was excised and analysed by MS after treatment with trypsin. MASCOT analysis confirmed that the indeed PqsC, and also showed a tryptic peptide identified protein was as ALPLDSQMECASFLLNLR (residues 120-137) carrying an additional mass of 126 Da, corresponding to an octanoyl moiety. This tryptic peptide contains many residues conserved in enzymes involved in condensation reactions, including the cysteine residue bearing the anthraniloyl group in PgsD (Zhang et al., 2008). The exact residue bearing the octanoyl group could not be identified by MS because it seemed too labile to survive collision-induced fragmentation of the peptide backbone. Nevertheless, we were able to determine that the octanoyl group was linked to the conserved cysteine residue, since a plasmid carrying a C129A mutation in pqsC could not complement the ability to produce HAQs of a pqsC- mutant, in contrast with the plasmid expressing the His-tagged pgsC. When overexpressing PgsC alone in E. coli, the same tryptic peptide was detected by MASCOT but without its octanoate adduct, an indication that the folding of PqsC and the binding of octanoate are linked, and promoted by PqsB.

Overexpressing an His-tagged PqsB construct in *E. coli* yielded a protein with the expected molecular weight (observed value: 31826 Da versus the theoretical value: 31830 Da), showing that there was no octanoyl group associated with this protein and that PqsB is not involved *in vivo* in providing octanoate to PqsC.

Interestingly, the co-purified His-tagged PqsB and PqsC when migrated together on a native polyacrylamide gel produce only one band, although their molecular weight differ considerably (Fig. 2.17). An attempt to purify the active form of PqsC without PqsB by co-expressing a His-tagged PqsC and a native PqsB using nickel-sepharose column failed, as PqsB was found to co-elute with PqsC, yet another indication of the tight association between these two enzymes.

In order to conclusively prove that octanoate is the immediate intermediate in the biosynthesis of HHQ, we added increasing amounts of octanoyl-CoA to a synthetic 2-ABA solution to which were added the co-purified His-tagged PqsB and PqsC. This resulted in increasing production of HHQ (Fig. 2.16b), demonstrating that octanoyl-CoA is the direct precursor of HHQ and that PqsC is the enzyme coupling octanoic acid to 2-ABA.



Figure 2.17. Polyacrylamide gels showing purified PqsB and PqsC. (a) Native gel of co-purified His-tagged PqsC and PqsB showing comigration (lane 1). (b) Denaturing gel showing purified PqsB and PqsC proteins (lane 1) and reanalysis of the complex from the native gel (a) after that the band was excised, showing two bands corresponding to PqsC and PqsB (lane 2). M= molecular weight ladder.

2.7 Supplemental figures





Supplemental Figure 2.12. Effect of dodecanoic acid addition on production of various *Pseudomonas aeruginosa* secondary metabolites. Production of (a) pyocyanin, (b) $3 - \infty - C_{12}$ -HSL and (c) the sum of PQS, HHQ and HQNO in a *P. aeruginosa* PA14 control culture in TSB (\blacktriangle) and upon supplementation with 1 mM dodecanoic acid (\blacksquare).



Supplemental Figure 2.13. Negative electrospray MS/MS spectrum of 2-ABA purified from *P. aeruginosa* culture supernatant. Collision energy of (a) 5 eV and (b) 15 eV.

2.8 Discussion

Our experiment with decanoic-9,9,10,10,10- d_5 acid clearly shows that this fatty acid can be directly incorporated into HAQs, a departure from the current hypothesis that the fatty acid part of HAQs is produced from *de novo* fatty acid synthesis. It is noteworthy to mention the extensive labeling of the HAQs (75%) eventhough this experiment was conducted in TSB rich medium in which *de novo* biosynthesis of fatty acids is likely to be activated. The fact that no label was retained when decanoic-1,2-¹³C₂ acid was fed to the bacteria is in total contradiction with the current accepted model that the quinoline ring of HAQs originates from a one-step head-to-tail condensation of 3-ketofatty acids with anthranilic acid (Heeb *et al.*, 2011).

Looking for an alternative to the one-step head-to-tail reaction, we found that an intermediate of HAQ biosynthesis is present in culture supernatants of nonpolar *pqsB*- and *pqsC*- mutants. Only the culture supernatants from these two nonpolar mutants provide the intermediate to nonpolar *pqsA*- or *pqsD*- mutants to produce HAQs. The results also show that PqsB and PqsC have to be present simultaneously to transform the intermediate into HHQ as the supernatant of a *pqsC*- mutant does not complement a *pqsB*- mutant, nor *vice versa*. The conclusion is that this extracellular intermediate is first synthesized by PqsA and PqsD, and is then further modified by PqsB and PqsC to produce HAQs. The fact that the supernatant of a double *pqsB*- *pqsL*- mutant enables the production of more HHQ than the supernatant of a single *pqsB*- mutant when fed to a *pqsA*- mutant also suggests that this intermediate is the substrate of PqsL in the production of HQNO.

This intermediate was identified as 2-ABA. Not unexpectedly, this compound once purified is rather unstable and tends to decompose into DHQ through attack of the carboxyl group of the acid function by the neighbouring amino group to produce the more stable quinoline ring of DHQ or, through decarboxylation of the rather unstable 3-ketofatty acid, into 2-AA. Interestingly the MS/MS analysis of 2-ABA also shows the loss of CO₂ as the main decomposition pathway, even at very low collision energies.

2-AA is a *P. aeruginosa* volatile metabolite found in liquid culture and in the lungs of people affected by cystic fibrosis (Cox *et al.*, 1979; Scott-Thomas *et al.*, 2010). 2-AA modulates the virulence of the bacteria and promotes a chronic infection phenotype (Kesarwani *et al.*, 2011), and can also modulate the immune response of the host (Bandyopadhaya *et al.*, 2012).

We knew that anthranilic acid is a precursor of 2-AA (Kesarwani *et al.*, 2011), but the pathway leading to the addition of a methyl group adjacent to the carbonyl was unknown. Feeding of a *pqsA- pqsH-* mutant with 2-ABA-1,2-¹³C₂ lead to quantitative labelling with one ¹³C, a demonstration that 2-AA is produced *in vivo* by the decarboxylation of 2-ABA, a reaction also spontaneously observed during the chemical synthesis of 2-ABA.

The feeding experiments with ¹³C-labelled acetate showed that the HHQ produced only incorporated one ¹³C and only if the label was at position 2 of acetate. The fact that only the carbon 2 of acetate was retained in HHQ implied that some form of malonate is involved in 2-ABA synthesis. That malonyl-CoA is the direct precursor of 2-ABA was demonstrated by the linearity of the dose-response production of HHQ-d₄ upon feeding incremental concentrations of malonyl-CoA to a cytoplasmic extract of a nonpolar *pqsB*⁻ *pqsL*⁻ mutant supplemented with anthranilic-d₄ acid, CoA and octanoyl-CoA. When synthetic 2-ABA-1,2-¹³C₂ was provided to the *pqsA- pqsH*-mutant, the HHQ produced was labeled with only one ¹³C. This proves that 2-ABA has to undergo decarboxylation upon coupling with octanoate, and this also explains the absence of labelling of HHQ when acetate labelled at position 1 is fed to the *pqsA- pqsH*-mutant, as the carbon of the carbonyl group of 2-ABA also originates from the carbon 1 of acetate (Fig. 2.12).

The experiment involving feeding the supernatant of a nonpolar *pqsB- pqsL-* mutant to a nonpolar *pqsA- pqsH-* mutant grown only with fully ¹³C-labelled acetate as carbon source led to the incorporation of eight labelled carbons, an indication that octanoate, in this case produced through *de novo* synthesis, is the immediate precursor of HHQ. When this experiment was repeated with a *pqsC-* mutant supernatant given to a nonpolar *pqsA- pqsH-* mutant fed with fully ¹³C-labelled octanoic acid instead of acetate, the same eight ¹³C labelling was obtained, confirming that octanoic acid can be directly incorporated into HHQ without having to originate from *de novo* synthesis. The dose-response *in vitro* production of HHQ starting with synthetic 2-ABA and purified PqsB and PqsC with increasing amounts of octanoyl-CoA proves that octanoyl-CoA is the other direct precursor of HHQ.

Taking these results together, we propose a two-step pathway for the biosynthesis of HAQs in *P. aeruginosa* (Fig. 2.12). Initially, PqsA activates anthranilic acid into anthraniloyl-CoA (Coleman *et al.*, 2008). Then anthraniloyl-CoA reacts with PqsD to produce anthraniloyl-PqsD, as described in the biosynthesis of DHQ (Zhang *et al.*, 2008). The next step involves the

reaction of anthraniloyl-PgsD with malonyl-CoA to form 2-ABA-CoA, as previously hypothesized for the synthesis of DHQ (Zhang et al., 2008). Then free 2-ABA undergoes decarboxylation and reacts with octanoate. This reaction is most likely performed by PqsC, as we have identified it as the carrier of the octanoyl group. Further supporting a model where PqsC is responsible for the coupling of the octanoate group and the closing of the quinoline ring, this group is located on the same conserved cysteine that carries anthranilate in PqsD (Zhang et al., 2008). Indeed, as noted by Zhang et al. (Zhang et al., 2008), PgsD and PgsC are structurally related as they both share the same cysteine 112 and histidine 244 found in the active site of E. coli FabH, although PqsC lacks the asparagine 274 shared by PqsD and FabH. As PqsD and FabH are both invoved in Claisen-type of condensations it is not unlikely that PqsC could perform the same type of reaction as depicted in Figure 2.12, with 2-ABA undergoing the loss of CO₂ in the same way malonyl-CoA does in the biosynthesis of DHQ. Although PqsC lacks asparagine 244, 2-ABA is much likely to easily undergo decarboxylation than malonyl-CoA which could explain the absence of this residue in the active site of PgsC. While malonyl-CoA plays an essential role in the synthesis of DHQ and HAQ, we have previously shown that DHQ is not a precursor of HAQs (Lépine et al., 2007).

What remains to be determined is how free 2-ABA is produced from 2-ABA-CoA. Although it is possible that this is achieved by PqsB, adding PqsB to anthraniloyl-CoA, malonyl-CoA and PqsD did not alter the production of DHQ. However, under the tested conditions, the free 2-ABA produced spontaneously decomposes into DHQ, as we found this compound as a degradation product of 2-ABA. PqsB could not either directly hydrolyse anthranoyl-CoA, which is somewhat structurally related to 2-ABA-CoA. In order to explain how free 2-ABA is found in the supernatant of a pgsB- mutant, we propose that in this mutant, unspecific thioesterases degrade the accumulating 2-ABA-CoA and that accumulated free 2-ABA is either excreted or diffused outside the cells. It is also possible that a 2-ABA-CoA-specific thioesterase exists. Thus, the role of PqsB remains to be confirmed but it is clear from the nondenaturing gel of the co-expressed PgsB-PgsC that these two enzymes are closely associated and that PgsB is required for PgsC to be active. When PqsC is expressed alone in E. coli, it is found mostly in the insoluble fraction of the cell hydrolysate while when it is co-expressed with PqsB it is mostly found in the cytoplasmic fraction. Also, the cysteine of the active site of PqsC was not substituted with octanoate when PqsC was expressed alone, while it was substituted when co-expressed in presence of PqsB. These two facts suggest that PqsB is mostly involved in the proper folding of PqsC rather than having a direct enzymatic role in the process.

Another interesting finding is that synthetic 2-ABA, when provided to a *pqsA- pqsH*mutant, also acts as a precursor of HQNO, along with HHQ. We have previously reported that *pqsL*, which codes for a monooxygenase, is required for the biosynthesis of HQNO (Lépine *et al.*, 2004), and also, somewhat surprisingly, that HHQ is not the direct precursor of HQNO (Déziel *et al.*, 2004). The present work indicates that 2-ABA is the likely elusive substrate of PqsL. Although we did not isolate the oxidized intermediate, we speculate that it is probably an hydroxylamino derivative of 2-ABA. The hydroxylamino function is strongly nucleophilic and capable to attack a neighbouring carbonyl group. Hydroxylamino groups are often obtained from the reduction of a nitro group with SnCl₂ and this approach is used for the one-step chemical synthesis of HQNO by reducing the 2-nitro group of 1-(2-nitrophenyl)tetradecanoate-1,3-dione with SnCl₂ (Taylor *et al.*, 1995). By analogy, the PqsL-mediated oxidation of the amino group of 2-ABA could produce a hydroxylamino group that would spontaneously attack the carbonyl function to produce HQNO (Fig. 2.12).

How do we reconcile our findings with prior claims that 3-ketofatty acids are the immediate precursors of HAQs ? (Bredenbruch et al., 2005; Luckner et al., 1965; Ritter et al., 1971; Pistorius et al., 2011). In fact, what was really demonstrated previously is that the carbons of the aliphatic chain alternatively originate from carbon 2 and carbon 1 of acetate, as expected from the *de novo* synthesis of fatty acids, and that the carbons 3 and 2 of the guinoline ring of HHQ also follow the same alternating origin, with these carbons originating from carbon 2 and 1 of acetate, respectively (Fig. 2.12). This is also true in the mechanism we propose, in which the carbon 2 of 2-ABA, which eventually ends up as carbon 3 of HHQ, also originates from carbon 2 of acetate, and for the carbon 1 of octanoate, which ends up as carbon 2 of HHQ, originates from carbon 1 of acetate, in the de novo biosynthesis of fatty acids. It remains to be determined whether the octanoic acid originates directly from *de novo* fatty acid synthesis or if it is rather a product of the β-oxidation of longer fatty acids. That octanoyl-CoA was found as a substrate of PqsC favours the second hypothesis because fatty acid-ACP, not fatty acid-CoAs, are the intermediate of de novo biosynthesis. Because labelling was predominant when labelled decanoic acid was provided exogenously, even when a rich culture medium was used, also supports the second hypothesis.

Pistorius *et al.* recently reported that the CoA and ACP esters of 3-ketodecanoic acid in presence of anthranoyl-CoA and purified PqsD did not produce HHQ, as predicted by Bera *et al.* (2009) who described the active site of PqsD as being too small to accommodate such large

substrates. But when Pistorius *et al.* fed free 3-ketodecanoic acid and anthranoyl-CoA to PqsD, they reported the production of HHQ (Pistorius *et al.*, 2011). However, as the authors themselves pointed out, their experiment cannot explain the essential role of PqsB and PqsC *in vivo.* Indeed, PqsD does not seem to be very substrate-specific as it can also accept benzoyl-CoA in addition to anthraniloyl-CoA (Pistorius *et al.*, 2011). Moreover, their observed Kcat for the reaction of HHQ with 3-ketodecanoic acid was three orders of magnitude lower than the one for producing DHQ, while the relative proportion of DHQ and HHQ is much closer to a one to one ratio in cultures (Lépine *et al.*, 2007). From this, we must conclude that 3-ketodecanoic can be transformed into HHQ *in vitro* with low efficiency by PqsD, but that 3-ketofatty acids are not the biologically relevant precursors of HAQs.

The discovery of the two-step mechanism responsible for the synthesis of HAQs is likely to foster the search for new and specific inhibitors of *P. aeruginosa* « quorum sensing » based on the 2-ABA structure, and provides a renewed perspective on the biosynthesis of 2-AA and HQNO, molecules with promising biological properties.

2.9 Significance

Groups of pathogenic bacteria employ diffusible signaling molecules to regulate their virulence in a concerted manner (*quorum sensing*). In *Pseudomonas aeruginosa*, one family of signalling molecules share a 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HAQ) structure, such as *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), and its direct precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ). PQS and HHQ activate the MvfR regulator, which then induces the expression of the *pqsABCDE* operon, responsible for the biosynthesis of HAQs.

Molecules produced from the activity of the *pqsABCD* gene products display additional biological activities besides MvfR activation. For instance, HHQ, PQS and 2-AA can modulate the innate immune response of mammalian hosts. Inhibition of the MvfR regulon by mutational inactivation decreases *P. aeruginosa* virulence. Furthermore, hindering HAQ synthesis protects mice from the infection, which confirms that HAQ biosynthesis is a promising target to control virulence of this bacterium.

We know that anthranilic acid is a precursor of HAQs. It is widely accepted that the other precursors of HAQs are 3-ketofatty acids that condense with anthranilic acid in a head-to-tail fashion.

The objective of the present work was to decipher the poorly understood HAQ biosynthetic pathway.

We have elucidated the function for PqsB, PqsC and PqsD in the biosynthesis of HAQs, and determined that the current model involving 3-ketofatty acids as precursors is incorrect. We have found that HAQ biosynthesis proceeds by a two-step pathway: (1) the PqsD enzyme mediates the synthesis of 2-aminobenzoylacetate (2-ABA) from anthraniloyl-CoA and malonyl-CoA, then (2) the decarboxylating coupling of 2-ABA to an octanoate group linked to PqsC produces HHQ. PqsB is tightly associated with PqsC and required for the second step.

Our findings rule out the long standing hypothesis that 3-ketofatty acids are the precursors of HAQs, and uncover promising targets for the development of specific antivirulence drugs to combat this opportunistic pathogen, for which we need alternatives to traditional antibiotics.

2.10 Acknowledgments

Thanks to Melissa Starkey for providing plasmid pMSR1. This study was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Operating grant to ED and a NSERC Discovery grant to FL. CED and VD were respectively recipients of a M.Sc. and a Ph.D. scholarship from the Fondation Armand-Frappier. ED was a Chercheur-boursier Junior 2 of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and holds a Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce projet était de déterminer la fonction enzymatique de PqsB et PqsC impliquées dans la voie de biosynthèse des HAQ produites par *P. aeruginosa*.

Au cours de ce projet nous avons optimisé les conditions d'expression de l'enzyme PqsB chez *E. coli* afin de minimiser la formation d'agrégats non fonctionnels *in vivo*, en utilisant la souche Origami[™] (DE3) et en diminuant la température d'incubation pendant la période de production de la protéine recombinante.

Nous avons construit un plasmide pour la production la protéine PqsC avec une étiquette 6xHis. Cette construction a permis de restaurer la production des HAQ chez un mutant PA14Δ*pqsC* non polaire. Cependant, pendant la production de PqsC chez *E. coli* le phénomène d'agrégation a représenté un obstacle majeur limitant sa purification par chromatographie d'affinité. Des essais pour minimiser l'agrégation *in vivo* on été réalisés sans amélioration notable sur les rendements en protéine soluble. Le repliement *in vitro* de la protéine à partir des corps d'inclusion a favorisé en partie la solubilisation de la protéine et a facilité sa purification. Cependant, lorsque les deux protéines purifiées ont été mis en réaction avec les composés précurseurs, le 2-ABA et l'octanoyl-CoA, la production de HHQ n'a pas pu être détectée, ce qui laisse subsister un doute quant à la fonctionnalité des enzymes purifiées.

Dans une autre tentative pour obtenir les deux enzymes sous forme fonctionnelle, nous avons coexprimé les protéines PqsB et PqsC chez la souche *E. coli* Origami[™] (DE3). Nous avons constaté que la coexpression a favorisé d'une façon importante la solubilité de ces deux protéines *in vivo* et a facilité également leur copurification. Des tests enzymatiques réalisés à partir des fractions cytoplasmiques au cours de l'étape de coproduction ainsi que des tests *in vitro* réalisés pendant la copurification avec l'addition de 2-ABA et d'octanoyl-CoA nous ont permis de détecter la production de HHQ, ce qui a confirmé que les deux protéines recombinantes étaient fonctionnelles sous ces conditions de production.

L'analyse sur gel d'acrylamide en conditions natives nous a confirmé que ces deux protéines migrent au même temps indiquant la présence d'interactions qui pourraient éventuellement donner lieu à la formation d'un complexe enzymatique. Nous avons pu mettre en évidence que PqsC est l'enzyme responsable du transport de l'octanoyle lors de la réaction de condensation avec le 2-ABA. En effet, l'analyse protéomique par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier un peptide tryptique ayant une masse additionnelle correspondante à la masse de l'octanoyle. Ultérieurement, par mutagénèse dirigée nous avons pu vérifier que le résidu cystéine 129 est directement impliqué dans la liaison avec l'octanoyle. Par ailleurs, nous avons vérifié *in vivo* que le plasmide portant le gène *pqsC* muté sur le résidu cystéine 129 n'a pas pu restaurer la production des HAQ chez un mutant PA14 $\Delta pqsC$ non polaire.

Dans un dernier effort pour isoler la protéine PqsC, les deux protéines ont été coexprimées chez *E. coli*, mais dans cette tentative, seulement l'enzyme PqsC était exprimée avec son étiquette 6xHis et aurait dû de cette façon être séparée de PqsB et les autres protéines cytoplasmiques lors de la purification sur une colonne de nickel. Cependant, l'analyse des fractions d'élution obtenues nous a montré que les deux protéines ont coélué, ce qui démontre que les interactions établies entre ces deux protéines étaient très fortes.

Le rôle de PqsB n'a pas pu être établi. Étant donnée que PqsC nécessite de PqsB pour être soluble, on considère que PqsB pourrait agir comme protéine chaperonne essentielle au repliement de PqsC et en conséquence essentielle à sa fonctionnalité. Des études structurales sur PqsB seront nécessaires pour déterminer si cette protéine possède une activité catalytique spécifique dans la réaction de couplage du 2-ABA avec l'octanoyl-CoA, ou bien, si son rôle est celui de complémenter la structure native de PqsC formant un complexe fonctionnel.

Finalement nous avons pu reproduire *in vitro* la deuxième étape de la voie de biosynthèse des HAQ à partir des enzymes PqsB et PqsC copurifiées et les composés précurseurs impliqués dans cette réaction, le 2-ABA et l'octanoyl-CoA. Ce résultat nous a permis de valider notre hypothèse que le composé intermédiaire 2-ABA condense avec l'octanoyle qui est transporté par PqsC pour générer du HHQ. Par ailleurs, au moyen de cette approche enzymatique nous allons pouvoir tester des inhibiteurs de cette réaction et ainsi ouvrir la voie à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et, par conséquent des antibiotiques plus efficaces pour contrer les infections causées par *P. aeruginosa*.

Références

Albus A, Pesci C, Runyen-Janecky L, West s & Iglewski B (1997) Vfr Controls Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology* 179(12): 3928-3935.

Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H & Mathee K (2013) A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research* 41: 1-20.

Bandyopadhaya A, Kesarwani M, Que Y, He J, Padfield K, Tompkins R & Rahme L (2012) The quorum sensing volatile molecule 2-amino acetophenon modulates host immune responses in a manner that promotes life with unwanted guests. *Plos Pathogens* 8: e1003024.

Bera A, Atanasova V, Robinson H, Eisenstein E, Coleman J, Pesci E & Parons J (2009) Structure of PqsD, a *Pseudomonas* quinolone signal biosynthetic enzyme, in complex with anthranilate. *Biochemistry* 48(36): 8644-8655.

Bernhard S (1983) Nucleophilic displacement reactions at ester and thiolester bonds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 421:28-40.

Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Hoiby N & Givskov M (2010) Interference of *Pseudomonas* aeruginosa signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12: e11.

Bredenbruch F, Geffers R, Nimtz M, Buer J & Haussler S (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Enviromental Microbiology* 8: 1318-1329.

Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Müller R & Häussler S (2005) Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Journal of Bacteriology* 187: 3630-3635.

Brooun A, Liu S & Lewis K (2000) A dose response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 640-6.

Calfee M, Coleman J & Pesci E (2001) Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 11633-11637.

Camilli A & Bassler BL (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311(5764):1113-1116.

Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R & Rahme L (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 14613-14618.

Coleman J, Hudson L, McKnight S, Farrow J, Calfee M, Lindsey C & Pesci E (2008) *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *Journal of Bacteriology* 190: 1247-1255.

Cornforth J & James A (1956) Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. *Biochemical Journal* 63: 124-130.

Costerton J, Geesey G & Cheng K (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238: 86-95. Cox C & Parker J (1979) Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Clinical Microbioogyl* 9: 479-484.

Davies C, Heath R, White S & Rock C (2000) The 1.8 Å crystal structure and active site architecture of β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase III (FabH) from *Escherichia coli*. *Structure* 8: 185–195.

De Kievit T & Iglewski B (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* 68(9): 4839-4849.

De Kievit T, Kakai Y, Register J, Pesci E & Iglewski B (2002) Role of the *Pseudomonas* aeruginosa las and *rhl* quorum-sensing systems in *rhll* regulation. *FEMS Microbiology Letters* 212(1) 101-106.

Dekimpe V & Déziel E (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155: 712-723.

Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G & Rahme LG (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhIRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular Microbiology* 55: 998-1014.

Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos M, Tompkins R & Rahme L (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2- alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 1339-1344.

Diggle S, Matthijs S, Wright V, Fletcher M, Chhabra S, Lamont I, Kong X, Hider R, 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. *Chemistry and Biology* 14: 87-96.

Diggle S, Winzer K, Chhabra S. Worrall K, 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. *Molecular Microbiology* 50(1): 29-43.

Driscoll J, Brody S, & Kollef M (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67: 351-368.

Egland K & Greenberg E (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxl* promoter. *Molecular Microbiology* 31(4) 1197-1204.

Essar D, Eberly L, Hadero A & Crawford I (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* 172: 884-900.

Farrow J & Pesci E (2007) Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *Journal of Bacteriology* 189(9): 3425-3433.

Farrow J, Sund Z, Ellison M, Wade D, Coleman J & Pesci E (2008) PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology* 190: 7043-7051.

Fuqua W, Winans S & Greenberg E (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176(2): 269–275.

Gallagher L, McKnight S, Kuznetsova M, Pesci E & Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 184: 6472-6480.

Galloway W, Hodgkinson J, Bowden S, Welch M & Spring D (2011) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and Al-2 Quorum Sensing Pathways. *Chemical Reviews* 111: 28–67.

Galloway W, Hodgkinson J, Bowden S, Welch M & Spring D (2012) Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 20: 449-458.

Greenberg E (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria. *Journal of Microbiology* 38: 117-121.

Heeb S, Fletcher M, Chhabra S, Diggle S, Williams P & Camara M (2011) Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 247-274.

Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N & Givskov M (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal* 22: 3803-3815.

Hoffman L, Déziel E, D'Argenio D, Lépine F, Emerson J, McNamara S, Gibson R, Ramsey B & Miller S (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 19890-19895.

Jander G, Rahme L & Ausubel F (2000) Positive Correlation between virulence of *Pseudomonas* aeruginosa mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology* 182(13): 338-344.

Jimenez P, Koch G, Thompson J, Xavier K, Cool R & Quax W (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1): 46-65.

Johnson D, Ishihama A, & Stevens A (2003) Involvement of region 4 of the sigma70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation of the lux operon during quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters* 228(2):193-201.

Jones S, Yu B, Bainton N, Birdsall M, Bycroft B, Chhabra S, Cox A, Golby P Reeves P & Stephens S (1993) The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal* 12(6): 2477-2482.

Juhas M, Eberl L, & Tummler B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbioogy* 7: 459-471.

Kerr K & Snelling A (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infections* 73: 338-344.

Kesarwani M, Hazan R, He J, Que Y, Apidianakis Y, Lesic B, Xiao G, Dekimpe V, Milot S, Deziel E, Lépine F & Rahme L (2011) A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS pathogens* 7(8): e1002192.

Kim K, Kim Y, Koh B, Hwang S, Kim S, Lépine F, Cho Y & Lee G HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. *Immunology* 129: 578-588.

Kung V, Ozer E, & Hauser A (2010) The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(4): 621–641.

Kurnasov O, Jablonski L, Polanuyer B, Dorrestein P, Begley T & Osterman A (2003) Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbioloy Letters* 227(2): 219-227.

Kwan J, 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*. *Molecular BioSystems* 7: 1205-1216.

Latifi A, Foglino M, Tanaka K, William 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. *Molecular Microbiology* 21(6): 1137-1146.

Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F & Guery B (2006) Quorum sensing: une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36: 349–357.

Lee D, Urbach J, Wu G, Liberati N, Feinbaum R, Miyata S, Diggins L, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme L & Ausubel F (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology* 7: R90.

Lépine F & Déziel E (2011) Liquid chromatography/mass spectrometry for the detection and quantification of N-acyl-L-homoserine lactones and 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Methods in Molecular Biology* 692: 61-69.

Lépine F, Dekimpe V, Lesic B, Milot S, Mamer O, Rahme L & Déziel E (2007) PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*. *Biological Chemical* 388: 839-845.

Lépine F, Déziel E, Milot S & Rahme L (2003) A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochimica et Biophysica Acta* 1622: 36-41.

Lépine F, Milot S, Déziel E, He J & Rahme L (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15: 862-869.

Lesic B & Rahme L (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Molecular Biology* 9: 20.

Lesic B, Lépine F, Déziel E, Zhang J, Zhang Q, Padfield K, Castonguay M, Milot S, Stachel S, Tzika A, Tompkins R & Rahme L (2007) Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathogenes* 3: 1229-1239.

Lightbown J (1954) An antagonist of streptomycin and dihydrostreptomycin produced by *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Genetic Microbiology* 11: 477-492.

Luckner M & Ritter C (1965) On the biosynthesis of the 2-n-alkyl-4-hydroxyquinolines *Pseudomonas aeruginosa* (schroet.) migula. *Tetrahedron Letters* 12: 741-744.

Maddocks S & Oyston P (2008) Structure and function on the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154(12): 3609-3623.

Mahajan-Miklos S, Tan M-W, Rahme L, & Ausubel F (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa - Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.

McGrath S, Wade D & Pesci E (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas* aeruginosa control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters* 230: 27-34.

Miller M & Bassler B (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-99.

Nunn D, Bergman S & Lory S (1990) Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *Journal of Bacteriology* 172: 2911-2919.

Overmyer C (1926) Synthesis of substitution derivatives of indigo. I. o-Nitrobenzoylacetic acid and related compounds. *Journal of the American Chemical Society* 48: 454-460.

Parsek M & Greenberg P (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8789–8793.

Pesci E, Milbank J, Pearson J, McKnight, Kende A, Greenberg E & Iglewski B (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20): 11229-11234.

Pesci E, Pearson J, Seed P & Iglewski B (1997) Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology* 197(10): 3127-3132.

Pistorius D, Ullrich A, Lucas S, Hartmann R, Kazmaier U & Müller R (2011) Biosynthesis of 2-Alkyl-4(1H)-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*: potential for therapeutic interference with pathogenicity. *ChemBioChem* 12, 850-853.

Rahme L, Stevens E, Wolfort S, Shao J, Tompkins R & Ausubel F (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219): 1899-1902.

Rahme L, Tan M-W, Le L, Wong S, Tompkins R, Calderwood S & Ausubel F (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(24): 13245-13250.

Rasmussen T, Skindersoe M. Bjarnsholt T, Phipps R, Christensen K, Jensen P, Andersen J, Koch B, Larsen T, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N & Givskov M (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151: 1325-1340.

Ritter C & Luckner M (1971) Biosynthesis of 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline derivatives (pseudane) in *Pseudomonas aeruginosa. European Journal of Biochemistry* 18: 391-400.

Schuster M, Urbanowski M & Greenberg E (2007) Promoter specificity in *Pseudomonas* aeruginosa quorum sensing revealed by DNA binging of purified LasR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(45): 15833-15839.

Scott-Thomas A, Syhre M, Pattemore P, Epton M, Laing R, Pearson J & Chambers S (2010) 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Medicine* 10.

Shapiro J (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review* of *Microbiology* 52(1): 81-104.

Sicker D & Mann G (1988) Synthesis of ethyl ortho-substituted benzoylacetates and investigation of the influence of ortho-substituents on keto enol tautomerism and MS fragmentation behavior. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 53: 839-850.

Singh P, Schaefer A, Parsek M, Moninger T, Welsh M & Greenberg E (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms *Nature* 407: 762-764.

Smith R & Iglewski B (2003) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology* 6: 56-60.

Soberon-Chavez G, Aguirre-Ramirez M. & Ordonez L (2005). Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quorum"?. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 171-182.

Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warrener P, Hickey M, Brinkman F, Hufnagle W, Kowalik D, Lagrou M, Garber R, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody L,

Coulter S, Folger K, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong G, Wu Z, Paulsen I, Reizer J, Saier M, Hancock R, Lory S & Olson M (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Tan M-W, Rahme L, Sternberg J, Tompkins R & Ausubel F (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(5): 2408-2413.

Taylor G & Lynn S (1995) Quinoline-type antimicrobials for use against *Helicobacter pylori* infections. *PCT Int. Appl.* WO 9528929 A1 19951102.

Van Delden C & Iglewski B (1998) Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases* 4(4): 551-560.

Vial L, Lépine F, Milot S, Groleau M, Dekimpe V, Woods D & Déziel E (2008) *Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of Bacteriology* 190: 5339-5352.

Wade D, Calfee M, Rocha E, Ling E, Engstrom E, Coleman J & Pesci E (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology* 187: 4372-4380.

Wang W & Malcolm B (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange (TM) site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680-682.

West S, Sample A & Runyen-Janecky L (1994) The vfr gene product, required for *Pseudomonas* aeruginosa exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor family. *Journal of Bacteriology* 176: 7532-7542.

Wells C (1951) Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Syntheses of PYO lb, PYO lc, and PYO III. *Journal of Biological Chemistry* 196: 331-340.

Winstanley C, Fothergill J (2009) The role of quorum-sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters* 290(1): 1-9.

Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, Castonguay MH, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE, & Rahme LG (2006 b) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular Microbiology* 62: 1689-1699.

Xiao G, He J & and Rahme L (2006 a) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152:1679-1686.

Zhang Y, Frank M, Zhu K, Mayasundari A & Rock C (2008) PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas* aeruginosa. Journal of Biological Chemical 283: 28788-28794.