



HAL
open science

**Rôle du quorum-sensing et prévalence des
bactériophages chez la bactérie phytostimulatrice
Azospirillum**

Mickaël Boyer

► **To cite this version:**

Mickaël Boyer. Rôle du quorum-sensing et prévalence des bactériophages chez la bactérie phytostimulatrice Azospirillum. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00443888

HAL Id: tel-00443888

<https://theses.hal.science/tel-00443888>

Submitted on 4 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 16 juillet 2008

par

M. Mickaël BOYER

**Rôle du quorum-sensing et prévalence des bactériophages
chez la bactérie phytostimulatrice *Azospirillum***

JURY :

M. Alain FILLOUX, Professeur, Imperial College London
M. Michael DUBOW, Professeur, Université Paris-Sud 11
Mme Nicole COTTE-PATTAT, Directrice de Recherche, CNRS
M. René ROHR, Professeur, Université Lyon 1
M. René BALLY, Directeur de Recherche, CNRS
Mme Florence WISNIEWSKI-DYÉ, Maître de Conférences, Université Lyon 1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres du jury d'avoir accepté de participer à l'évaluation de cette thèse. Je remercie Madame Nicole Cotte-Pattat et Monsieur Michael Dubow d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. J'exprime également tous mes remerciements à Monsieur Alain Filloux et Monsieur René Rohr pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier René Bally pour avoir assuré la direction de cette thèse et pour m'avoir confié ce projet de recherche.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Florence Wisniewski-Dyé pour son encadrement exemplaire durant cette thèse. Je te remercie sincèrement pour ton implication au quotidien durant ces cinq années au laboratoire. Ta rigueur scientifique, ta disponibilité, ton attention, ton esprit critique et tes qualités exceptionnelles pour l'écriture m'ont beaucoup aidé à progresser et à mener à bien ce projet de thèse. De part tes compétences, tu m'as ainsi donné une formation de qualité ; je saurai en faire bon usage par la suite.

Je remercie Yvan Moëgne-Loccoz pour m'avoir accueilli dans son équipe depuis le DEA ainsi que pour sa contribution positive à mon encadrement de DEA qui a constitué une année charnière de mon cursus.

Je tiens à remercier Denis Faure, Patrick Mavingui et William Nasser qui ont fait partie de mon comité de pilotage de thèse et qui m'ont ainsi aidé et encouragé à poursuivre les différents travaux entrepris en début de thèse. Je remercie particulièrement Patrick Mavingui pour les nombreuses discussions scientifiques et pour ses conseils, notamment sur les phages.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont également participé à ce travail, en particulier Jacqueline Haurat pour son aide précieuse à la réalisation de nombreuses expériences. Je remercie aussi René Rohr pour m'avoir fait partager sa grande expérience dans le domaine de la microscopie électronique et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à visualiser mes premières particules phagiques. Je remercie également le personnel du Génoscope pour la qualité de leur collaboration dans le projet phage. Mes remerciements vont également à Sandrine Perrotto, qui a fortement facilité mon apprentissage de la protéomique,

et également à Emilie Bagnarol pour ses conseils en protéomique et sur les dosages de sidérophores.

Un très grand merci à Ludovic Vial. Tu as su me transmettre ton expérience et tes compétences, notamment en biologie moléculaire car la bio. mol. n'avait déjà presque plus de secret pour toi quand je suis arrivé dans l'équipe. Merci aussi pour m'avoir transmis une certaine philosophie de vie au laboratoire (discussions scientifiques dans le couloir, l'excitation des derniers résultats, les nocturnes, RDV café, etc...)

Je remercie également Emilie Mathiotte et Sophie Jacquemet pour les travaux réalisés durant leur stage et pour leur contribution à l'avancée de mon projet de thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe Rhizosphère qui, de près ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail.

Evidemment, un grand merci à Ghislaine sans qui la vie au laboratoire ne serait pas la même. Je te remercie pour ton aide technique qui a été essentielle au bon déroulement des expériences, mais aussi pour le dynamisme et l'énergie que tu apportes à la vie quotidienne de chacun dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne.

Je remercie amicalement toutes les personnes permanentes du laboratoire avec qui j'ai pu interagir pendant ces cinq années, ainsi que tous les étudiants qui forment une communauté jouant un rôle important dans l'intégration des nouveaux entrants et dans le maintien d'un environnement de travail agréable. Comme ils sont nombreux et que leur vie au laboratoire n'est qu'éphémère, je n'en citerais que quelques uns parmi lesquels : Arnault, Aymeric, Céline, Den's, Hervé, Ludo, Marina, Jo, Emilie (les anciens !); Bastien, Edwige, Elé, Sandrine, Stéph, Thom (promo 2004 !); et les nouveaux (car je suis devenu un ancien !) Arnault, Béné, Clothilde, Emeline, Karima, Olivier, Martina, Vincent...

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes parents pour leur soutien et pour leurs encouragements pendant toutes ces longues années d'études. Séverine, c'est plus qu'un merci que je te dois ; car ton aide, ton soutien et ton attention ont contribué à maintenir un équilibre entre vie professionnel et personnel, ce qui a fortement contribué à la réussite de ce travail.

Introduction Générale	- 1 -
Chapitre I : Synthèse bibliographique	- 6 -
Introduction	- 6 -
1. Les différents niveaux de régulation cellulaire modulant la synthèse et l'accumulation de molécules signal de type AHL	- 8 -
1.1. Les déterminants génétiques à la base du QS	- 8 -
1.1.1 Synthèse des AHLs.....	- 8 -
1.1.2. Les protéines de type LuxR	- 9 -
1.2. Régulation du QS par des régulateurs transcriptionnels	- 11 -
1.2.1 Rôle des systèmes à deux composants.....	- 11 -
1.2.2. Autres régulateurs transcriptionnels	- 12 -
1.3. Régulation post-transcriptionnelle	- 13 -
1.4. Enzymes dégradatrices des AHLs.....	- 14 -
1.5. Diffusion/Transport des AHLs à travers la membrane	- 16 -
1.6. Régulation de la production d'AHLs par d'autres molécules signal endogènes	- 17 -
2. Paramètres environnementaux influençant la production, la stabilité et la dégradation des molécules signal de type AHL	- 19 -
2.1. Effets des facteurs abiotiques sur le QS	- 19 -
2.1.1. Effets du pH et de la température	- 19 -
2.1.2. Effets de la composition du milieu	- 20 -
2.1.3. Effets des transferts de masse	- 21 -
2.1.3.1. Rôle du processus de diffusion.....	- 21 -
2.1.3.2. Rôle du processus d'advection	- 22 -
2.2. Effets des facteurs biotiques sur le QS.....	- 23 -
2.2.1. Effet de la population bactérienne	- 23 -
2.2.1.1. Rôle de la densité cellulaire.....	- 23 -
2.2.1.2. Rôle de la répartition spatiale des cellules.....	- 24 -
2.2.2. Influence de la communauté	- 25 -
2.2.2.1. Inactivation des AHLs par dégradation enzymatique.....	- 25 -
2.2.2.2. Communication croisée entre espèces bactériennes	- 26 -
2.2.2.3. Séquestration du signal.....	- 27 -
2.2.2.4. Barrière de diffusion du signal	- 28 -
2.2.3. Influence des eucaryotes sur la communication bactérienne	- 28 -
2.2.3.1. Inactivation des AHLs par dégradation enzymatique.....	- 28 -
2.2.3.2. Composés produits par des algues.....	- 28 -
2.2.3.3. Composés produits par des plantes.....	- 29 -
2.2.3.4. Composés produits par des champignons.....	- 30 -
2.2.3.5. Molécules produites par des mammifères et autres eucaryotes	- 30 -
3. Rôle de la communication cellulaire via les AHLs chez les bactéries associées aux plantes : analogies et impact écologique	- 31 -
3.1. Rôle du QS dans la colonisation de la plante	- 32 -
3.1.1. La mobilité.....	- 32 -
3.1.2. Les exopolysaccharides	- 33 -
3.1.3. Les biofilms	- 34 -
3.1.3.1. Les biofilms chez les bactéries phyto-bénéfiques.....	- 34 -
3.1.3.2. Les biofilms chez les bactéries phytopathogènes	- 36 -
3.2. Les métabolites secondaires.....	- 37 -
3.3. Le transfert de plasmides	- 38 -

3.4. Effets des AHLs sur la plante	- 39 -
Conclusion	- 40 -
 Chapitre II : Caractérisation des fonctions régulées par QS chez	
<i>A. lipoferum</i>.....	- 43 -
Introduction	- 43 -
A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in <i>Azospirillum lipoferum</i>	- 45 -
Abstract	- 46 -
Introduction	- 47 -
Methods	- 49 -
Bacterial growth conditions and AHL extraction.	- 49 -
Strain construction.	- 49 -
Motility assays.	- 49 -
Pectinase and cellulase activities.	- 50 -
Siderophore production.	- 50 -
IAA production.	- 50 -
Plant growth promotion assay.	- 50 -
Protein extraction.	- 51 -
Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE).	- 51 -
Gel analysis and protein identification.	- 52 -
Results	- 52 -
Effects of AttM production on AHLs accumulation in <i>A. lipoferum</i>	- 52 -
Phenotypes affected by AHL inactivation in <i>A. lipoferum</i>	- 53 -
Effects of AHL inactivation on <i>A. lipoferum</i> plant-growth promoting ability.	- 53 -
Effects of AHL inactivation on <i>A. lipoferum</i> proteome.	- 54 -
Identification of QS regulated proteins in <i>A. lipoferum</i> B518.	- 55 -
Discussion	- 56 -
AttM-mediated inactivation of AHL signals in <i>A. lipoferum</i>	- 56 -
Effects of AHL inactivation on pectinase activity and plant-growth promoting ability.	- 56 -
Functions of potential importance for rhizosphere competence and root colonization by <i>Azospirillum</i>	- 57 -
Specificity of the QS regulons in <i>Azospirillum</i>	- 58 -
Acknowledgements	- 59 -
References	- 59 -
 Chapitre III : Caractérisation et régulation de gènes d'origine phagique	
adjacents aux gènes impliqués dans le QS chez <i>A. lipoferum</i> TVV3 ...	- 64 -
1. Introduction	- 64 -
2. Matériels et Méthodes	- 66 -
2.1. Souches bactériennes et conditions de cultures.	- 66 -
2.2. Séquençage d'ADN et analyses bioinformatiques	- 66 -
2.3. Amplification par PCR.	- 67 -
2.4. RT-PCR	- 67 -
2.4.1. Conditions de culture et préparation de culots bactériens.	- 67 -
2.4.2. Extraction des ARNm.	- 68 -
2.5. Induction à la mitomycine C et extraction de l'ADN phagique	- 68 -

2.6. Préparation des échantillons pour la MET	- 69 -
2.7. Migration de l'ADN phagique en électrophorèse classique et PFGE	- 69 -
3. Résultats	- 70 -
3.1. Séquençage complet d'une région de 30 kb contenant les gènes <i>alpR</i> et <i>alpI</i>	- 70 -
3.2. Effet de l'inactivation des AHLs sur l'expression d'ORFs adjacents à <i>alpR/alpI</i>	- 72 -
3.3. Caractérisation d'un bactériophage chez TVV3	- 73 -
4. Discussion	- 75 -
4.1. Caractérisation de l'environnement génétique des gènes <i>alpR/alpI</i>	- 75 -
4.2. Caractérisation d'un bactériophage chez <i>A. lipoferum</i> TVV3.....	- 77 -
4.3. La présence des gènes <i>alpR/alpI</i> dans le génome de TVV3 résulte-t-elle d'un transfert horizontal de gènes via un bactériophage ?.....	- 78 -
4.4. Rôle du QS chez <i>A. lipoferum</i> TVV3 ?.....	- 79 -
5. Conclusion	- 80 -
Chapitre IV : Prévalence des bactériophages au sein du genre <i>Azospirillum</i> ..	
..... - 82 -	
Introduction	- 82 -
Bacteriophage prevalence in <i>Azospirillum</i> and analysis of the first genome sequence of an <i>Azospirillum brasiliense</i> integrative phage.....	- 85 -
Abstract	- 86 -
Introduction	- 87 -
Materials and Methods.....	- 88 -
Media and bacterial growth conditions.....	- 88 -
Induction and purification of phage particles.....	- 88 -
Transmission electron microscopy (TEM).....	- 89 -
PFGE of phage DNA and hybridization experiments.....	- 89 -
DNA sequencing and bioinformatics analyses.....	- 90 -
Phylogenetic analysis of functional genes.....	- 90 -
Plasmid content and prophage localization.....	- 91 -
Results	- 91 -
Induction of temperate phages from different <i>Azospirillum</i> strains.....	- 91 -
Morphological study of <i>Azospirillum</i> bacteriophages.....	- 92 -
Relatedness of <i>Azospirillum</i> bacteriophages at the genomic level.....	- 92 -
Complete nucleotide sequence of Φ Ab-Cd genome.....	- 93 -
Phylogenetic analysis of functional genes.....	- 95 -
Genome localization of Φ Ab-Cd prophage.....	- 96 -
Discussion	- 97 -
Prevalence and morphology of <i>Azospirillum</i> bacteriophages.....	- 97 -
Relatedness among <i>Azospirillum</i> phage genomes.....	- 98 -
Phage genome sequence.....	- 99 -
Phages and dynamics of bacterial genomes and bacterial community.....	- 100 -
Acknowledgements.....	- 101 -
References	- 101 -

Conclusion et Perspectives	- 107 -
1. Rôle du QS chez <i>A. lipoferum</i>	- 107 -
2. Les bactériophages chez <i>Azospirillum</i>	- 111 -
3. Contribution des phages à la dynamique des génomes chez <i>Azospirillum</i>	- 114 -
Références bibliographiques.....	- 116 -
Annexes.....	- 153 -
Annexe 1 : Composition des milieux de culture	- 153 -
Annexe 2 : Extraction des ARNs	- 155 -

Liste des Figures

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Figure 1.1: Modèle schématique du quorum-sensing.	6
Figure 1.2: Structure de différentes molécules signal identifiées chez les bactéries.	7
Figure 1.3 : Structure de différentes AHLs.	8
Figure 1.4: Modèle schématique de synthèse et de transduction du signal AHL au sein d'une cellule bactérienne à Gram négatif.	9
Figure 1.5: Représentation schématique des modifications structurales induites par la liaison des AHLs sur les protéines de type LuxR activatrices ou inhibitrices de la transcription.	10
Figure 1.6 : Représentation du réseau de régulation des systèmes Las et Rhl chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Figure 1.7 : Régulation post-transcriptionnelle du QS par le système GacS/GacA/Rsm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A) et <i>Erwinia carotovora</i> (B).	13
Figure 1.8 : Mécanismes enzymatiques de dégradation des AHLs.	14
Figure 1.9 : Stabilité du noyau lactone des HSL, C ₃ -HSL et C ₄ -HSL en fonction du pH.	19
Figure 1.10 : Effet de la température sur la cinétique de production des AHLs par <i>Pectobacterium atrosepticum</i> 6276.	20
Figure 1.11 : Représentation schématique de l'influence des transferts de masse sur la concentration de molécules signal au sein de biofilms.	21
Figure 1.12 : Modélisation de l'effet de la distribution spatiale des cellules bactériennes sur la production de molécules signal.	24
Figure 1.13 : Effets des opines produites par la plante sur la régulation du QS chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
Figure 1.14 : Régulation par QS de la mobilité par essaimage chez <i>Rhizobium etli</i>	32
Figure 1.15 : Impact du QS sur la formation de biofilm chez <i>Pantoea stewartii</i>	36
Figure 1.16 : Modèle de régulation par le QS du transfert conjugatif de pRL1JI chez <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	38

Chapitre II : Caractérisation des fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum*

Figure 2.1: Thin layer chromatography of AHLs from wild-type, AttM-expressing and vector control <i>Azospirillum lipoferum</i> strains.	52
Figure 2.2: Pectinase activity, siderophore production and IAA production of AttM-expressing and vector control <i>Azospirillum lipoferum</i> strains.	53

Figure 2.3: SDS-PAGE of proteins extracted from AttM-expressing and vector control <i>Azospirillum lipoferum</i> strains.	54
Figure 2.4: 2D-PAGE analysis of intracellular and extracellular proteins of <i>A. lipoferum</i> B518(pBBR1) and B518(pBBR1- <i>attM</i>) strains.	55

Chapitre III : Caractérisation et régulation de gènes d'origine phagique adjacents aux gènes impliqués dans le QS chez *A. lipoferum* TVV3

Figure 3.1 : Organisation génétique de la région de 30 kb contenant les gènes <i>alpR</i> et <i>alpI</i> . 70	
Figure 3.2 : Analyse de l'ORF 5 présentant des homologies avec les gènes codant des protéines de type RTX.....	72
Figure 3.3 : Comparaison de la transcription d'ORFs identifiés sur le cosmide pR1.4 par RT-PCR semi-quantitative entre les souches TVV3, TVV3(pBBR1) et TVV3(pBBR1- <i>attM</i>).....	73
Figure 3.4 : Observations au MET par coloration négative de têtes (flèches noires) et de queues (flèches blanches) de particules phagiques extraites de cultures de TVV3 induites à la mitomycine C.	73
Figure 3.5 : Migration sur gel d'agarose de l'ADN extrait de particules phagiques issues de culture de TVV3 induites à la mitomycine C.....	74

Chapitre IV : Prévalence des bactériophages au sein du genre *Azospirillum*

Figure 4.1: Effect of mitomycin C treatment on growth of <i>Azospirillum</i>	91
Figure 4.2: TEM micrographs of negatively stained bacteriophages particles of <i>Azospirillum</i> . 92	
Figure 4.3: PFGE of DNA molecules isolated from phage particles (A) and hybridization experiments (B).	93
Figure 4.4: Restriction analysis of phage DNAs.	93
Figure 4.5: Genome map of Φ Ab-Cd and homology with pRhico.	97
Figure 4.6: Unrooted neighbour-joining trees based on the aligned amino acid sequences encoded by four phage genes.	98
Figure 4.7: Genome localization of Φ Ab-Cd.	99

Liste des Tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau 1.1 : Bactéries dégradatrices d’AHLs identifiées à ce jour.	15
Tableau 1.2 : Production par des organismes eucaryotes de composés interférant avec le QS. 28	
Tableau 1.3 : Exemples de bactéries interagissant avec les plantes et utilisant un système de régulation de type QS.	31

Chapitre II : Caractérisation des fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum*

Table 2.1 : Analysis of phenotypes affected by heterologous expression of the AttM lactonase in <i>A. lipoferum</i> strains.	52
Table 2.2 : Effects of <i>A. lipoferum</i> inoculation on root system architecture of rice.....	54
Table 2.3 : Identification by LC-ESI/MS/MS peptide sequencing of proteins induced or repressed by quorum-sensing in <i>A. lipoferum</i> B518.	56

Chapitre III : Caractérisation et régulation de gènes d’origine phagique adjacents aux gènes impliqués dans le QS chez *A. lipoferum* TVV3

Tableau 3.1 : Amorces utilisées dans cette étude.....	67
Tableau 3.2 : Caractéristiques des ORFs présents sur la région de 30 kb contenant <i>alpR</i> et <i>alpI</i>	71

Chapitre IV : Prévalence des bactériophages au sein du genre *Azospirillum*

Table 4.1 : <i>Azospirillum</i> strains used in this study.	88
Table 4.2 : Genome organization of <i>A. brasilense</i> phages Φ Ab-Cd	94

Introduction Générale

Introduction Générale

L'agriculture est née avec la mise en terre de semences ou de graines par l'homme. Au début, il s'agissait pour lui d'assurer sa survie en produisant le juste nécessaire (agriculture de subsistance). Aujourd'hui avec une croissance démographique forte, l'augmentation du niveau de vie des pays les plus développés et la mondialisation des marchés, l'agriculture est devenue intensive à l'extrême en s'appuyant sur la mécanisation et les moyens modernes de l'agronomie (fertilisation, biologie, génétique, etc...). L'agriculture moderne a permis d'augmenter la production agricole, mais l'agriculture industrielle intensive est de plus en plus critiquée en raison des dégradations de l'environnement dont elle est parfois responsable, ainsi que de la survenue récente de crises alimentaires assez sérieuses pour que l'opinion publique s'en inquiète. D'un point de vue environnemental, ces dégradations s'observent en particulier par la pollution des eaux due à l'utilisation massive d'engrais azotés et par la pollution des sols due à l'utilisation de produits phytosanitaires. Toutefois, ces dégradations environnementales, liées à l'agriculture industrielle, au développement industriel et au fort accroissement de la population mondiale, ont soulevé de nombreuses questions et entraîné le développement, voire l'apparition de nouvelles préoccupations pour la science agronomique (dépollution, traitement des déchets, aménagement rural, lutte biologique).

Certains microorganismes naturellement présents dans les sols sont capables d'améliorer la croissance des plantes et leur utilisation peut être envisagée comme une alternative aux engrais chimiques, permettant de satisfaire des intérêts à la fois écologiques et économiques. L'introduction d'inocula microbiens dans les systèmes sol/plante peut ainsi permettre d'augmenter les rendements des plantes. Les microorganismes utilisés sous forme de « bioengrais » peuvent être des bactéries, des champignons ou des algues et sont exploités pour leurs propriétés phytobénéfiques telles que la fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation/mobilisation d'éléments nutritifs présents dans le sol, et la sécrétion de substances stimulant la croissance des plantes. Les microorganismes phytobénéfiques sont de deux types : (i) ceux qui établissent une relation de symbiose véritable (association à bénéfices réciproques) avec la plante, c'est le cas par exemple de la symbiose mycorhizienne entre certains champignons du sol et la plupart des espèces végétales (Smith & Read, 1997) ou de la symbiose fixatrice d'azote entre l'alpha-protéobactérie *Rhizobium* en association avec les Légumineuses (Long, 1996) ; (ii) et ceux qui restent à l'état libre dans le sol ou localisés à

l'intérieur des racines (endophytes) (Gray & Smith, 2005) et qui établissent avec la plante une relation facultative à bénéfices réciproques appelée coopération ou symbiose associative.

Parmi les microorganismes établissant une symbiose associative avec la plante, se trouve un ensemble de bactéries qualifiées de PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) pour leurs effets stimulateurs de la croissance des plantes qu'elles colonisent. Ces rhizobactéries sont présentes dans une zone d'interface entre la plante et le sol, appelée rhizosphère, et qui désigne le volume de sol englobant immédiatement les racines vivantes et qui est influencé physiquement, chimiquement et biologiquement par leur activité (Foster, 1988). La rhizosphère constitue un écotone riche en nutriments du à la sécrétion par les racines de composés organiques dans le sol environnant, phénomène désigné sous le nom d'exsudation racinaire. Les microorganismes profitent donc d'apports en éléments nutritifs qui vont stimuler leur croissance ; en retour, les populations résidentes de PGPR pourront exercer leurs effets phytobénéfiques sur la plante. Les PGPR peuvent être classées en différentes catégories en fonction du type d'effet phytobénéfique qu'elles exercent (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Certaines sont par exemple qualifiées de biofertilisantes car elles fixent l'azote atmosphérique, ce qui contribue à augmenter la quantité d'azote dans les sols et à améliorer la croissance des plantes lorsque ce composé est peu abondant dans le sol. Les PGPR sont qualifiées de phytostimulatrices lorsqu'elles favorisent directement la croissance des plantes, la plupart du temps par la production de phytohormones. D'autres PGPR sont capable de protéger les plantes des infections par des microorganismes phytopathogènes ; dans ce cas l'effet exercé sur la plante par ce mécanisme de phytoprotection est donc indirect. Les bactéries PGPR appartiennent à différents genres bactériens et sont principalement documentées chez les protéobactéries telles qu'*Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* et chez des firmicutes telles que *Bacillus*. Cependant, toutes les souches bactériennes d'un genre particulier ou d'une même espèce ne présentent pas systématiquement un effet PGPR.

De nombreux essais d'inoculation au champ avec des souches du genre *Azospirillum* ont démontré les effets phytobénéfiques de cette bactérie, le rendement des récoltes pouvant être augmentés de 10 à 30 % (Dobbelaere *et al.*, 2001; Okon, 1994; Okon & Itzigsohn, 1995; Okon & Vanderleyden, 1997). Les bactéries du genre *Azospirillum*, qui appartiennent à la classe des alpha-protéobactéries, font ainsi partie des PGPR modèles les mieux caractérisées (Bashan *et al.*, 2004). Elles occupent en effet une position prédominante parmi les bactéries libres fixatrices d'azote au sein de la rhizosphère de nombreuses Graminées de grande culture comme le blé, le maïs ou le riz. Actuellement, 13 espèces ont été décrites au sein du genre *Azospirillum*, les plus étudiées étant les espèces *A. brasilense* et *A. lipoferum*. Les bactéries du

genre *Azospirillum* ont été initialement étudiées pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, mais de nombreuses études ont montré que la part d'azote apporté à la plante par *Azospirillum* était minimale (Bashan & Levanony, 1989). En revanche, l'effet phytostimulateur d'*Azospirillum* serait principalement dû à la synthèse de phytohormones. L'effet phytostimulateur d'*Azospirillum* se matérialise ainsi par une augmentation du volume du système racinaire, ce qui améliore la nutrition hydrique et minérale de la plante. Pour améliorer les connaissances de l'effet d'*Azospirillum* sur la croissance des plantes, de nombreuses études se sont focalisées sur les mécanismes impliqués dans l'effet phytostimulateur tels que la fixation d'azote, la production de phytohormones, et sur les caractéristiques permettant la colonisation des racines (chimiotactisme, mobilité, adhésion). Hormis ces études ciblées, les mécanismes généraux impliqués dans l'adaptation de la bactérie à son environnement rhizosphérique et dans le maintien des populations d'*Azospirillum* au sein des communautés rhizosphériques demeurent peu documentés ; toutefois, leur compréhension est indispensable pour comprendre l'écologie de cette bactérie.

Pour assurer leur développement et leur survie au sein d'un biotope, les microorganismes possèdent tout un ensemble de systèmes de régulation génétique. Ces systèmes de régulation génétique permettent notamment d'induire ou de réprimer des fonctions bactériennes dont l'expression constitutive serait coûteuse en énergie et défavorable à la bactérie dans certaines conditions. Des mécanismes de régulation permettent ainsi de moduler l'expression de certains gènes au niveau de l'ensemble de la population en fonction des changements d'environnement. Deux mécanismes peuvent être distingués : (i) une réponse individuelle des cellules en réponse à un stimulus exogène qui nécessite une protéine kinase (« senseur ») fonctionnant en tandem avec un régulateur de transcription, ces deux protéines formant un système à deux composants ; (ii) une réponse concertée des cellules capables d'évaluer la densité de la population via l'accumulation d'une molécule signal dans l'environnement et d'exprimer des gènes cibles uniquement à forte densité cellulaire, phénomène appelé quorum-sensing (QS). Le QS est un mécanisme de communication cellulaire permettant notamment de réguler des fonctions impliquées dans une interaction avec un hôte eucaryote.

Chez la bactérie rhizosphérique *Azospirillum*, l'analyse d'une quarantaine de souches appartenant à six espèces différentes a révélé que quatre souches de l'espèce *lipoferum* isolées de la rhizosphère du riz produisaient des molécules signal de type *N*-acyl-homosérine lactone (AHLs) (Vial *et al.*, 2006a). Chez différentes bactéries phytopathogènes ou phytobénéfiques, certaines fonctions impliquées dans l'interaction avec la plante sont régulées par un mécanisme de QS utilisant des AHLs (Marketon *et al.*, 2003; Pirhonen *et al.*, 1993; Wood *et*

al., 1997). Les AHLs produites par certaines souches d'*Azospirillum* pourraient leur permettre de réguler des phénotypes en fonction de l'environnement rencontré (substrats disponibles, présence d'une plante hôte, interaction avec la plante). Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était d'identifier les fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum*. D'un point de vue méthodologique, après avoir réussi à inactiver les AHLs produites par *A. lipoferum*, deux stratégies complémentaires ont été entreprises pour atteindre cet objectif : (i) une première approche, ciblée, a consisté à analyser des phénotypes particuliers potentiellement régulés par QS ; une seconde approche, globale, a consisté à comparer le protéome des souches n'accumulant plus d'AHLs avec celui des souches sauvages afin d'identifier des protéines différentiellement exprimées.

Chez de nombreuses bactéries, les gènes régulés par QS sont situés dans l'environnement génétique des gènes impliqués dans la synthèse d'AHLs. Sur les quatre souches d'*A. lipoferum* produisant des AHLs, les gènes impliqués dans la production de ce type de molécule signal n'ont pu être identifiés que chez la souche *A. lipoferum* TVV3 (Vial, 2005; Vial *et al.*, 2006a). Des séquences d'environ 2 kb de part et d'autre de ces gènes avaient été initialement obtenues dans le but d'identifier des gènes cibles régulés par QS (Vial, 2005). L'analyse de cette région avait révélé le regroupement de plusieurs ORFs adjacents aux gènes du QS et codant potentiellement des protéines phagiques, indiquant l'insertion d'un prophage dans cette région. En parallèle, des particules phagiques avaient pu être mises en évidence après l'induction des cultures de TVV3 à la mitomycine C (Vial, 2005). Cependant, ces travaux initiaux n'avaient pas pu permettre d'établir l'existence d'un lien entre les gènes de prophage adjacents aux gènes du QS et la production de particules phagiques. Dans la continuité de ces travaux, nous avons poursuivi la caractérisation de l'environnement génétique des gènes impliqués dans la synthèse d'AHLs chez cette souche après avoir obtenu le séquençage d'une région d'environ 29 kb contenant les gènes du QS. L'expression de certains ORFs adjacents aux gènes du QS a pu être analysée par RT-PCR semi-quantitative dans la souche TVV3 sauvage et dans la souche n'accumulant plus d'AHLs afin de déterminer si le QS pouvait réguler l'expression de ces ORFs. En parallèle, la caractérisation des particules phagiques formées à partir de cultures de TVV3 induites à la mitomycine C a été approfondie, afin de déterminer si leur production pouvait résulter de l'induction d'un phage tempéré dans l'environnement des gènes du QS.

Jusque là, peu de données étaient disponibles concernant l'existence et le rôle des phages chez les bactéries appartenant au genre *Azospirillum*. Des travaux réalisés au début des années 1980, avaient montré qu'il était possible d'induire la production de phages chez différentes souches d'*Azospirillum* (Franche & Elmerich, 1981). De plus, Germida (1984) a

montré qu'un phage pouvait être induit à partir de cultures des souches *A. brasilense* Sp7 et CD, mais aucune donnée de génomique n'était disponible dans cette étude (Germida, 1984). Cependant, les phages jouent un rôle important dans les populations bactériennes ; ils sont notamment impliqués dans les transferts horizontaux de gènes entre populations bactériennes et participeraient, par la lyse cellulaire engendrée par leur cycle lytique, à la dynamique des populations dans les écosystèmes (Canchaya *et al.*, 2003a; Suttle, 2005; Weinbauer, 2004). En interagissant étroitement avec les bactéries, les phages contribueraient ainsi à maintenir une certaine diversité chez les procaryotes (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Les phages ont été particulièrement mis en évidence et étudiés chez les bactéries pathogènes ou d'intérêt industriel, mais leur rôle chez des bactéries commensales ou symbiotiques reste encore peu connu. Les différents résultats préliminaires obtenus dans de précédentes études sur les phages chez *Azospirillum* (Franche & Elmerich, 1981; Germida, 1984) ainsi que la mise en évidence d'un phage chez la souche *A. lipoferum* TVV3 nous ont donc amené à analyser leur prévalence au sein du genre *Azospirillum*. De plus, nous avons pu obtenir le premier génome séquencé d'un bactériophage isolé d'une souche d'*Azospirillum*.

Ce document de thèse comprend quatre chapitres : une synthèse bibliographique et trois chapitres expérimentaux. Le premier chapitre constitue une synthèse des connaissances actuelles sur les processus de régulation par QS et de son rôle dans les interactions entre bactéries et plantes. Le deuxième chapitre présente les travaux réalisés dans le cadre de la recherche de fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum* et de son implication potentielle dans l'interaction *Azospirillum*-plante. Le troisième chapitre se focalise plus spécifiquement sur la souche d'*A. lipoferum* TVV3 et présente les résultats obtenus sur la caractérisation de la région adjacente aux gènes impliqués dans la synthèse d'AHLs, et qui ont permis d'orienter les travaux sur la caractérisation d'un phage tempéré chez TVV3. Dans le quatrième chapitre, est présentée une analyse de la prévalence des phages au sein du genre *Azospirillum*, ainsi que la caractérisation de la première séquence d'un phage isolé de la souche *A. brasilense* Cd. Enfin, les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont discutés afin de comprendre leur signification écologique chez les bactéries PGPR *Azospirillum* et de proposer des perspectives d'études dans la continuité de ces travaux.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

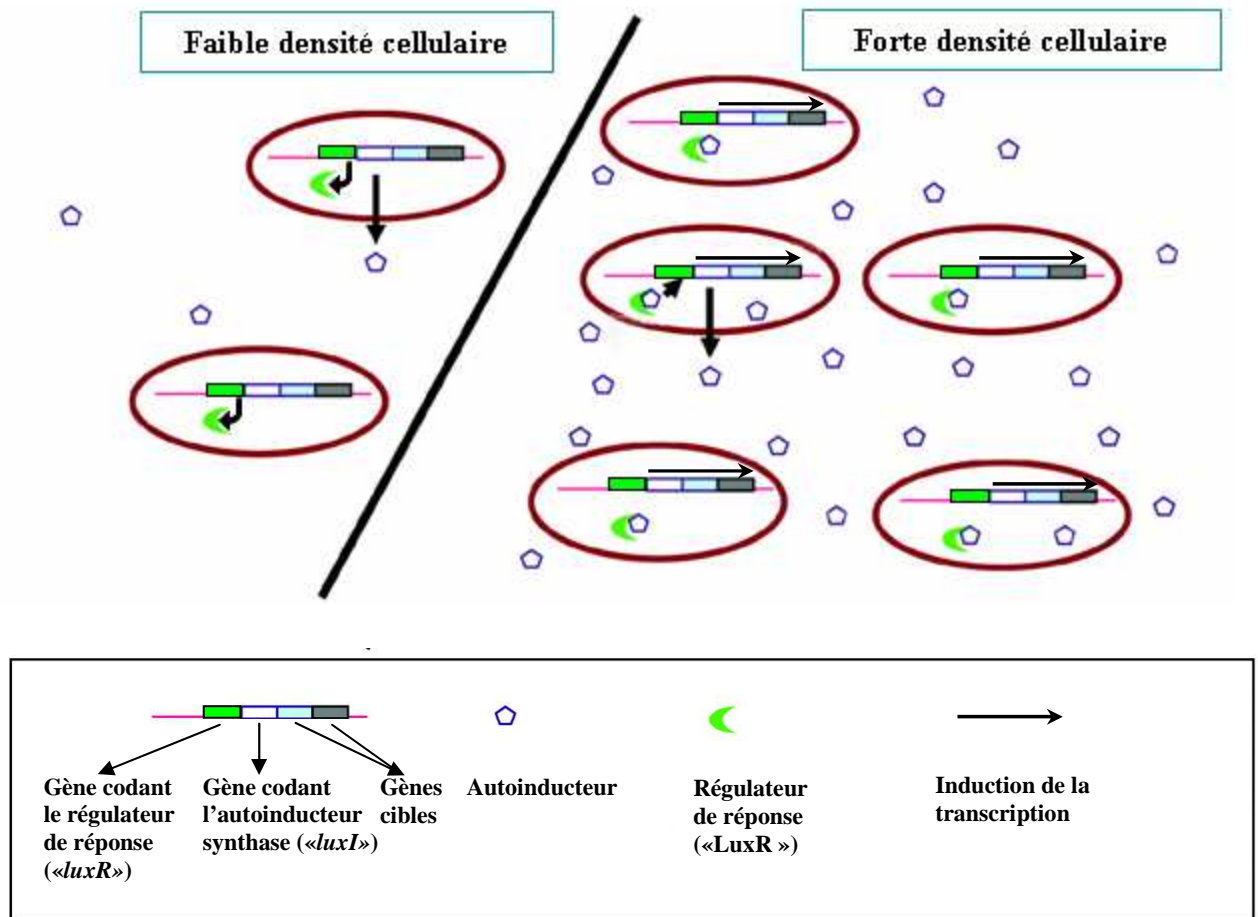


Figure 1.1: Modèle schématique du quorum-sensing.

A faible densité cellulaire, les molécules signal synthétisées par l'autoinducteur synthase sont en concentration trop faible pour être perçues par le régulateur de réponse. A densité cellulaire élevée, l'augmentation du nombre de bactéries provoque une accumulation de molécules signal dans le milieu. Lorsqu'une concentration seuil est atteinte, l'autoinducteur forme un complexe avec le régulateur de réponse qui, une fois activé, régule la transcription des gènes cibles.

(Adapté de González et Keshavan, 2006)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Introduction

En biologie, la sélection naturelle est un mécanisme agissant au niveau individuel car elle sélectionne les individus les plus adaptés à leur environnement ; elle permet ainsi de conserver les génomes dans lesquels les mutations confèrent un avantage à l'individu. La théorie de la sélection naturelle est l'un des mécanismes qui guide l'évolution des espèces et qui permet d'expliquer comment l'environnement influence l'évolution des populations. Ainsi, les écologistes suggèrent que le plus important niveau d'organisation pour une espèce se situe au niveau de la population. Comme les processus évolutifs semblent agir au niveau individuel, il semble important que les individus d'une même espèce puissent interagir entre eux pour assurer le maintien de la population au sein des communautés. Le phénomène de communication est un moyen pour les individus d'une même espèce d'interagir entre eux via des échanges de signaux. La "communication" est le processus de transmission d'informations et peut donc être considérée comme un processus de mise en commun d'informations et de connaissances. La communication permet ainsi d'agir de manière concertée au sein de la population et a donc un rôle dans les comportements sociaux.

Des recherches menées ces deux dernières décennies ont révélé que les cellules bactériennes dans leur environnement naturel ne sont pas associables, mais qu'elles peuvent interagir de manière coopérative dans des contextes de symbiose, d'adaptation à une niche, de production de métabolites secondaires, de résistance aux défenses des organismes supérieurs, ou de coexistence sous forme de biofilms. Ces comportements collectifs finement régulés impliquent que les bactéries d'une même espèce puissent se reconnaître entre elles sans forcément établir un contact cellulaire. Une manière différente pour établir un contact est de pouvoir communiquer via de petites molécules diffusibles assimilables à des phéromones car une fois synthétisées, elles peuvent diffuser à l'intérieur et hors des cellules bactériennes pour faciliter la communication entre les cellules. Ce langage bactérien appelé « quorum-sensing » décrit les mécanismes de communication cellulaire qui permettent généralement de coordonner l'expression d'un ensemble de gènes lorsque la population bactérienne atteint une densité importante (Fuqua & Winans, 1994). En effet, lorsque la densité de population bactérienne augmente, la synthèse de molécules signal, appelées aussi autoinducteurs, augmente également, ainsi que leur concentration dans le milieu extérieur (**Figure 1.1**). A partir du moment où la concentration en molécules signal atteint un certain seuil, les bactéries peuvent détecter ces molécules, ce qui permet l'activation ou la répression de gènes cibles régulés par la densité cellulaire. Ce mécanisme permet donc à chaque bactérie,

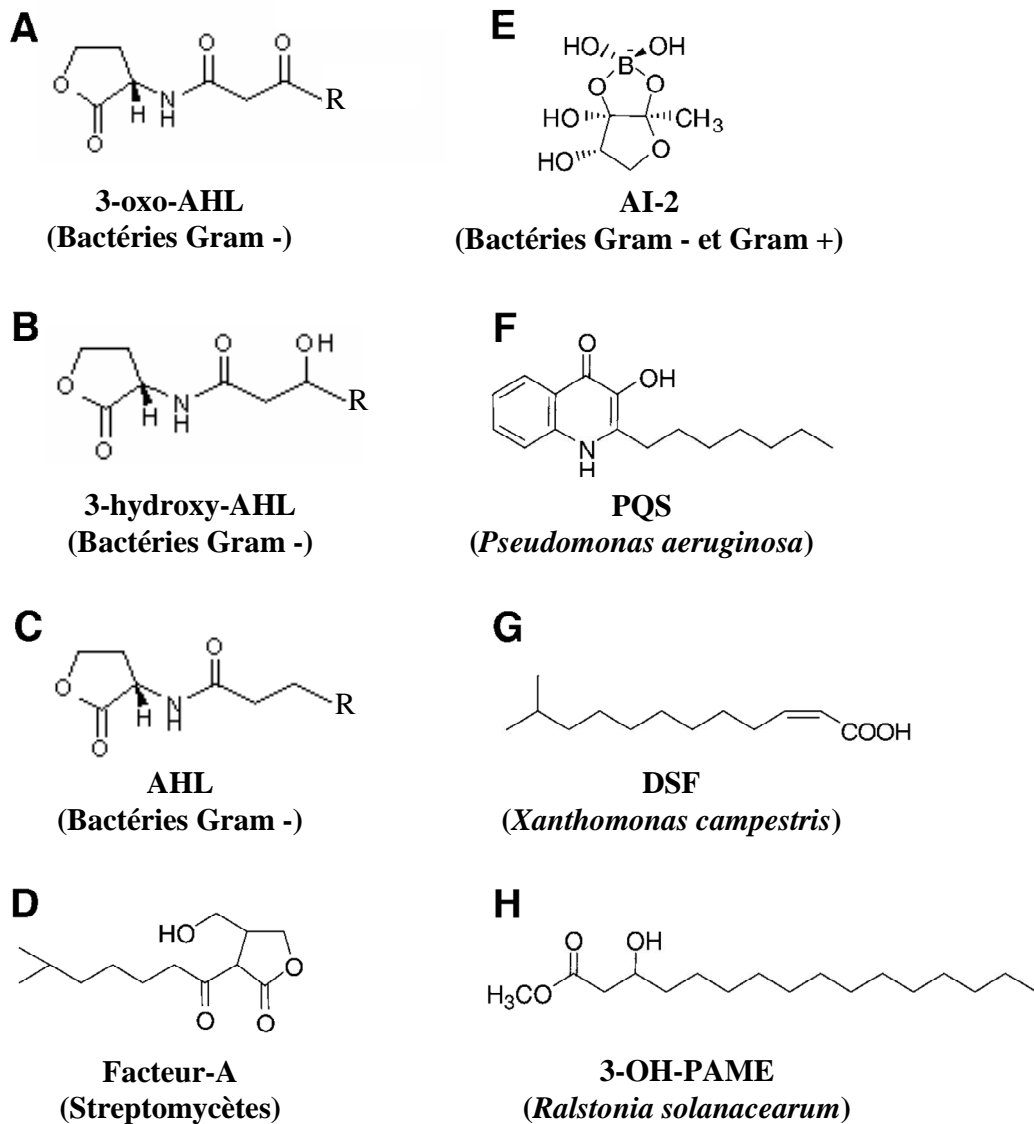


Figure 1.2: Structure de différentes molécules signal identifiées chez les bactéries.

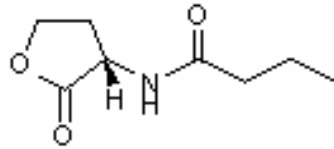
3-oxo-AHL, *N*-(3-oxoacyl) homoserine lactone; (B) 3-hydroxy-AHL, *N*-(3-hydroxyacyl) homoserine lactone et (C) AHL, *N*-acylhomoserine lactone avec R pouvant varier de C1 à C15. (D) Facteur A, 2-isocapryloyl-3-hydroxy-méthyl-gamma-butyrolactone; (E) AI-2, autoinducteur-2 ou furanosyl borate ester; (F) PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal ou 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H) quinolone; (G) DSF, 'diffusible factor' ou acide méthyl dodécénoïque ; (H) 3-OH-PAME, ester méthylique de l'acide 3-hydroxypalmitique.

(Adapté de Williams et *al.*, 2007)

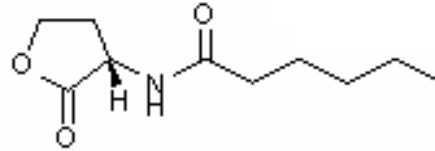
individuellement de percevoir le moment où la population minimale ou *quorum* est atteinte, afin d'initier une réponse concertée. Processus décrit chez un grand nombre d'espèces bactérienne, le quorum-sensing régule une assez grande diversité de phénotypes tels que la formation de biofilms, la production d'exopolysaccharides, la production de facteurs de virulence, la mobilité, autant de fonctions qui sont essentielles à l'établissement d'interactions symbiotiques ou pathogènes entre la bactérie et un hôte eucaryote (Waters & Bassler, 2005; Whitehead *et al.*, 2001).

Le concept de quorum-sensing (QS) est né de recherches menées sur des populations clonales dont la croissance est réalisée en culture liquide au laboratoire ; cependant les populations naturelles capables de produire des molécules signal évoluent dans des environnements complexes où fluctuent biodiversité et paramètres physico-chimiques. La nature du processus de signalisation dans ces différents environnements peut donc être assez différent, influencée à la fois par des modulations de production du signal et par sa dynamique de diffusion. De plus, le nombre important d'études sur le QS montre que ce processus est plus complexe qu'initialement décrit, et qu'il est intégré dans un réseau global de régulation de gènes intégrant les multiples signaux externes (pH, composition du milieu, *etc...*) afin de favoriser l'adaptation des bactéries aux stress environnementaux. Preuve également de cette complexité, les bactéries ont développé plusieurs systèmes de régulation par QS impliquant différents types de molécules signal, en particulier les *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs) qui ont été détectées chez plus de 70 genres bactériens à Gram négatif (**Figure 1.2**).

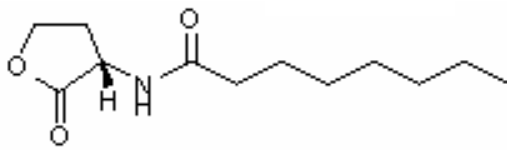
Les bactéries ne vivant pas isolées dans leur milieu, un ensemble de paramètres favorables ne dépendant pas uniquement de la densité cellulaire est nécessaire pour coordonner efficacement au sein de la population les fonctions régulées par QS. Cette condition implique que la bactérie puisse percevoir les différents paramètres du milieu et exprimer ainsi les fonctions régulées par QS en adéquation avec le type d'environnement rencontré. Les différents niveaux de régulation cellulaire impliqués dans la production de molécules signal ainsi que les facteurs environnementaux influençant leur accumulation dans le milieu extracellulaire seront présentés dans cette synthèse : régulation de la synthèse de molécules signal, présence de systèmes endogènes dégradant les signaux, présence de multiples systèmes QS, coordination des systèmes QS avec d'autres systèmes de régulation, et influence de l'environnement abiotique et biotique (autres organismes) sur le QS des bactéries. Les molécules signal les plus étudiées étant les *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs), nous limiterons notre étude à ce type de molécule. Afin d'illustrer l'importance de la régulation par QS dans les interactions bactéries-hôte, nous analyserons en dernier lieu les fonctions régulées via les AHLs chez les bactéries associées aux plantes.



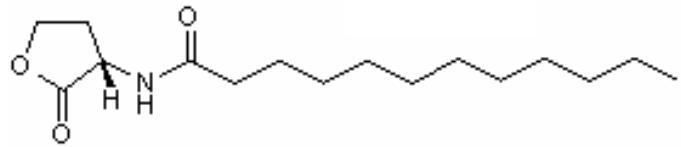
N-butyryl-L-homosérine lactone
C₄-HSL



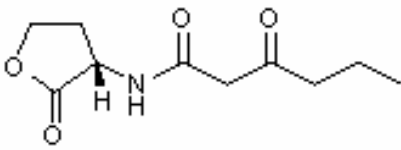
N-hexanoyl-L-homosérine lactone
C₆-HSL



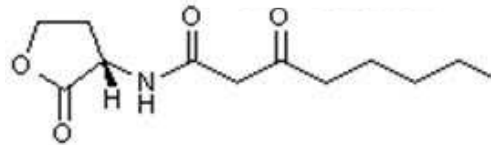
N-octanoyl-L-homosérine lactone
C₈-HSL



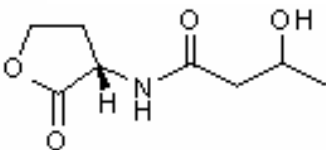
N-dodécanoyl-L-homosérine lactone
C₁₂-HSL



N-3oxo-hexanoyl-L-homosérine lactone
3oxo, C₆-HSL



N-3oxo-octanoyl-L-homosérine lactone
3oxo, C₈-HSL



N-3-hydroxy-butyryl-L-homosérine lactone
3OH, C₄-HSL



N-7,8-cis-tetradecenoyl-L-homosérine lactone
C_{14:1}-HSL

Figure 1.3 : Structure de différentes AHLs.

D'après « Quorum sensing site », <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/AHLs.htm>.

1. Les différents niveaux de régulation cellulaire modulant la synthèse et l'accumulation de molécules signal de type AHL

1.1. Les déterminants génétiques à la base du QS

1.1.1 Synthèse des AHLs

La synthèse des AHLs repose sur la présence chez les bactéries d'un ou plusieurs gènes codant des AHL synthases. Actuellement, trois familles de protéines codant des AHL synthases ont été caractérisées, la plus commune regroupant les protéines de type LuxI qui ont été identifiées chez un nombre important de bactéries appartenant aux subdivisions α , β , et γ des protéobactéries. Les deux autres familles sont constituées des protéines sans similarité avec LuxI, la première regroupant les protéines de type LuxM identifiées chez plusieurs espèces de *Vibrio*, la seconde étant représentée pour l'instant uniquement par l'enzyme HdtS identifiée chez *Pseudomonas fluorescens* (Bassler *et al.*, 1993; Hanzelka *et al.*, 1999; Laue *et al.*, 2000; Milton *et al.*, 2001). Les protéines de type LuxI synthétisent les AHLs en catalysant la liaison amide entre la chaîne d'acide gras portée par une protéine porteuse d'un groupement acyle (ACP) et le groupe aminé d'une molécule de *S*-adénosyl méthionine (SAM) (**Figure 1.3**). La lactonisation de la molécule a ensuite lieu avec le détachement de la 5'-méthylthioadénosine (Schaefer *et al.*, 1996). Il a été montré par mutagénèse de LuxI et RhII, respectivement AHLs synthases de *V. fischeri* et *P. aeruginosa*, que certains acides aminés conservés dans la partie *N*-terminale seraient impliqués dans l'activité synthase. La partie *C*-terminale moins conservée serait impliquée dans la reconnaissance des différentes chaînes d'acides gras apportées par l'ACP et donc dans la spécificité de l'AHL synthétisée (Hanzelka *et al.*, 1997). La synthèse d'AHLs implique que le donneur d'acide gras (ACP) et que la SAM, respectivement impliqués dans la biosynthèse des acides gras et la biosynthèse de la méthionine, soient disponible dans la cellule ; mais ces substrats ne semblent pas limitant dans le cytoplasme car leurs voies de biosynthèse sont essentielles à la bactérie (Parsek *et al.*, 1999).

Même si le mécanisme de synthèse des AHLs semble commun entre les différentes AHL synthases, la structure des AHLs peut varier en fonction de la taille et de la composition de la chaîne acyle. En effet, les AHLs répertoriées ont des chaînes acyles de quatre à dix-huit atomes de carbone, saturées ou non, et comportant un éventuel substituant hydroxyle ou cétone au niveau du carbone en position C3 de la chaîne acyle (**Figure 1.4**). Cette diversité de structures des AHLs s'explique principalement par l'affinité des AHLs synthases pour les différentes ACP mais aussi par la quantité disponible dans la cellule de chaque type d'ACP.

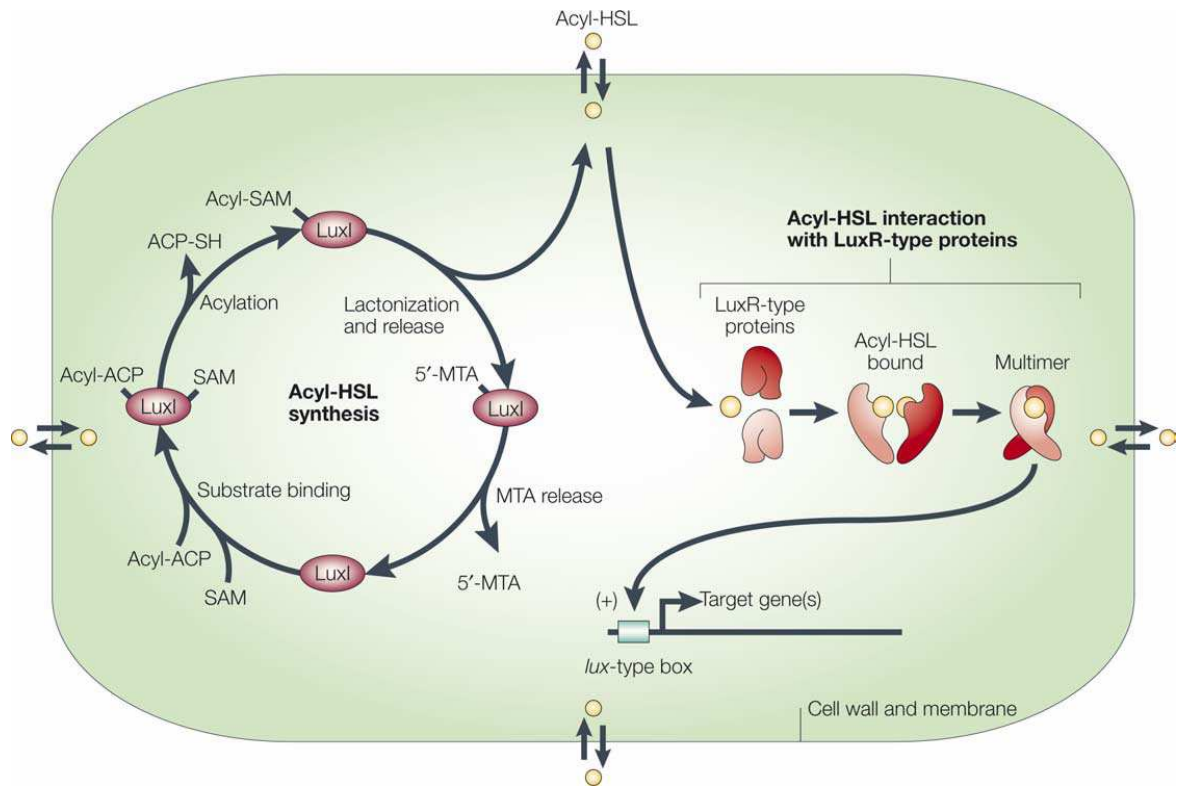


Figure 1.4: Modèle schématique de synthèse et de transduction du signal AHL au sein d'une cellule bactérienne à Gram négatif.

La synthèse des AHLs réalisée par les protéines de type LuxI ainsi que l'interaction des AHLs avec les protéines de types LuxR sont représentées d'une manière générale. La double flèche noire au niveau de l'enveloppe cellulaire indique la capacité des AHLs à diffuser vers l'extérieur ou l'intérieur de la cellule. La fixation des AHLs aux protéines LuxR et la multimérisation sont présentées comme des événements distincts, mais il est probable que ces deux processus soient simultanés. ACP, "acyl carrier protein" ; MTA, méthylthioadénosine ; SAM, S-adénosylméthionine ; HSL, homosérine lactone; AHL, N-acyl-homosérine lactone. (Adapté de Daniels *et al.*, 2004)

Des études sur EsaI et LasI, AHL synthases respectives de *Pantoea stewartii* et *Pseudomonas aeruginosa*, suggèrent que la nature de la chaîne acyle des AHLs dépend de la conformation et de la taille du site actif de l'enzyme permettant l'accès à des acyl-ACP de longueur définie (Taga & Bassler, 2003; Watson *et al.*, 2002). Ces différences de conformation sont également liées à la séquence protéique de l'enzyme qui varie sensiblement entre synthases d'une même famille ; il est donc difficile de prédire par analyse bioinformatique la nature des AHLs synthétisées pour une AHL synthase donnée (Williams, 2007). Certaines AHLs synthases n'utilisent pas spécifiquement comme substrat un seul type d'acyl-ACP, ce qui peut conduire à la synthèse d'AHLs de nature différente chez une même bactérie. Les techniques récentes de caractérisation des AHLs ont par exemple permis de montrer que la protéine YtbI, homologue de LuxI présent chez *Yersinia pseudotuberculosis*, permettait la synthèse d'au moins 24 AHLs différentes, mais dont certaines sont majoritaires (Ortori *et al.*, 2007). De plus, certaines bactéries possèdent dans leur génome plusieurs gènes codant des AHLs synthases, chacune permettant la synthèse d'un nombre limité d'AHLs. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, rhizobactérie pour laquelle le quorum-sensing a bien été étudié, possèdent quatre protéines de type LuxI (CinI, RaiI, RhiI, et TraI) qui permettent la synthèse d'au moins six AHLs différentes (Gonzalez & Marketon, 2003). La disponibilité en substrat, la spécificité des AHLs synthases, la présence de différentes AHLs synthases dans la cellule, conditionnent la cinétique de production et la nature des AHLs synthétisées par la bactérie.

1.1.2. Les protéines de type LuxR

La perception du signal AHL repose sur un senseur qui est aussi un régulateur de transcription appartenant à la famille LuxR, en référence à la protéine régulatrice initialement mise en évidence chez *V. fischeri* et régulant le phénomène de bioluminescence. L'alignement des acides aminés des différentes protéines de type LuxR (environ deux cent cinquante acides aminés) révèle peu de similarité entre les différentes séquences protéiques (de 18% à 25% d'identité) ; seuls cinq résidus seraient conservés chez l'ensemble des protéines LuxR (Whitehead *et al.*, 2001). En revanche, les protéines homologues de LuxR possèdent une architecture conservée composée de trois régions : une région *N*-terminale impliquée dans l'interaction avec les AHLs, une région plus centrale permettant l'oligomérisation de la protéine, et une région *C*-terminale possédant un motif hélice-tour-hélice impliqué dans la fixation sur l'ADN (Fuqua & Greenberg, 2002; Stevens & Greenberg, 1997). La fixation de l'AHL au niveau des protéines de type LuxR a été démontrée expérimentalement pour la protéine TraR, homologue de LuxR identifié chez *Agrobacterium tumefaciens* ; cette dernière a été purifiée complexée à l'AHL (Zhu & Winans, 1999). Ces protéines peuvent se lier aux

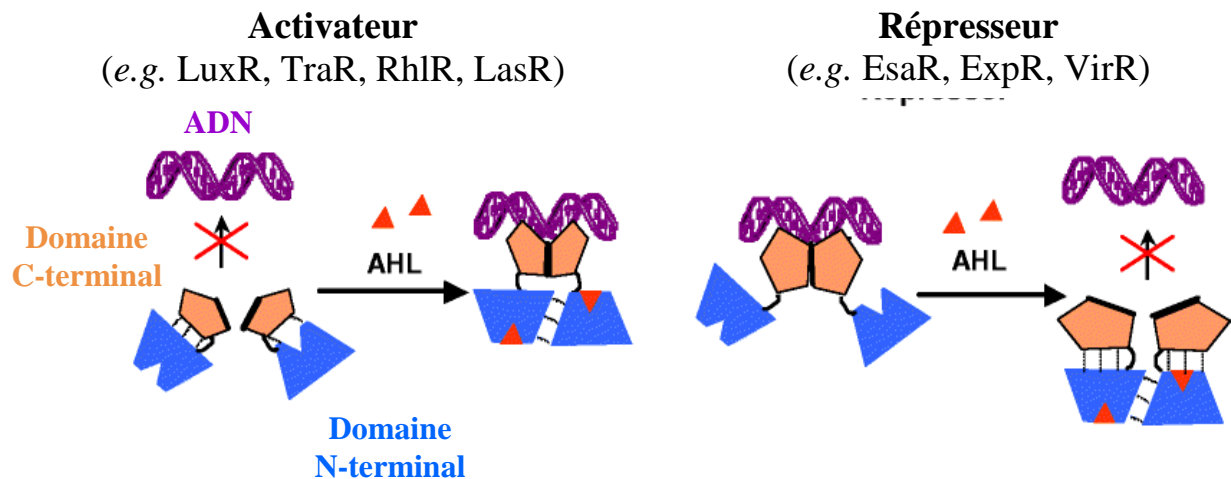


Figure 1.5: Représentation schématique des modifications structurales induites par la liaison des AHLs sur les protéines de type LuxR activatrices ou inhibitrices de la transcription.

Pour les protéines de type LuxR agissant comme des activateurs transcriptionnels : en absence d'AHLs, le domaine N-terminal (N-ter) masque le domaine C-terminal (C-ter) impliqué dans la liaison avec l'ADN et empêche la formation du complexe ADN/LuxR. La liaison des AHLs au domaine N-ter induit des changements conformationnels libérant le domaine C-ter, ce qui permet l'interaction ADN/LuxR et l'activation de la transcription de gènes cibles. LuxR, TraR, RhIR, LasR sont des homologues de LuxR identifiés respectivement chez *V. fischeri*, *A. tumefaciens* et *P. aeruginosa*. Pour les protéines de type LuxR agissant comme des répresseurs: en absence d'AHLs, ces protéines sont fixées sur les promoteurs des gènes cibles, réprimant leur transcription. La fixation d'AHLs sur le domaine N-ter provoque la dimérisation des régulateurs, ce qui entraîne la dissociation du complexe ADN/LuxR et donc la levée de la répression. Ces régulateurs pourraient également activer la transcription d'autres gènes en absence d'AHLs. EsaR, ExpR, VirR, sont des homologues de LuxR identifiés respectivement chez *P. stewartii*, *E. chrysanthemi* et *E. carotovora*.

(Adapté de Nasser et Reverchon, 2006)

AHLs dans un ratio protéine : ligand de 1:1, induisant leur propre multimérisation, ce qui provoquerait des modifications conformationnelles de la protéine libérant leur domaine de fixation à l'ADN (**Figure 1.5**).

La partie C-terminale des protéines de type LuxR possède une symétrie axiale qui favorise la fixation de cette protéine au niveau de séquences palindromiques d'ADN d'environ 18-20 pb, appelées boîte *lux* (Whiteley & Greenberg, 2001). La fixation des protéines au niveau des boîtes *lux*, qui se situent à environ 40 pb en amont des gènes régulés, active la transcription de ces gènes cibles, en interagissant avec la partie C-terminale de la sous unité α de l'ARN polymérase (Egland & Greenberg, 1999). Des résidus critiques pour cette interaction ont été identifiés au niveau de la protéine TraR d'*A. tumefaciens* (White & Winans, 2005). Ces séquences palindromiques ont été mises en évidence chez de nombreuses bactéries (boîtes *las* chez *P. aeruginosa*, boîtes *tra* chez *A. tumefaciens*) ; cependant la présence de ce type de séquences en amont des gènes régulés ne semble pas systématique.

Contrairement aux protéines de type LuxR qui régulent la transcription de gènes cibles en réponse à la présence d'AHLs, plusieurs homologues de LuxR ont la capacité d'exister sous forme de dimère et de se lier à l'ADN en absence d'AHLs, tel que EsaR de *Pantoea stewartii* (**Figure 1.5**). L'expression de gènes cibles est réprimée par l'interaction de ces régulateurs au niveau de boîtes *lux* chevauchant les promoteurs de ces gènes. En effet, la présence de répresseurs au niveau des boîtes *lux* provoque un encombrement stérique, empêchant l'accès de l'ARN polymérase. L'association des AHLs aux régulateurs diminue leur affinité pour l'ADN et lève donc l'effet répresseur.

Chez de nombreuses bactéries, telles que *A. tumefaciens*, *P. aeruginosa*, *V. fischeri*, les gènes codant les AHLs synthases font partie de l'ensemble des gènes régulés positivement par le complexe LuxR/AHL. Cette boucle d'auto-régulation positive provoquerait une amplification significative de la production d'AHLs, ce qui permettrait de coordonner de manière efficace, au niveau de la population entière, l'ensemble des phénotypes régulés par QS. A l'inverse, pour limiter la régulation des gènes cibles lorsque les conditions ne sont pas favorables à la bactérie, des protéines anti-activatrices telles que TraM et TrlR chez *A. tumefaciens* ou QscR chez *P. aeruginosa*, peuvent interagir avec des protéines de type LuxR en limitant leur activité. Ces protéines auraient pour rôle d'empêcher la régulation des gènes cibles du QS à faible densité cellulaire et donc de limiter la synthèse d'AHLs, notamment en bloquant le processus d'auto-régulation.

Plusieurs couples de gènes homologues à *luxR/I* peuvent être présents chez une même souche bactérienne ; ces différents systèmes *luxR/I* sont souvent organisés en réseaux si bien qu'un système *luxR/I* peut exercer un contrôle transcriptionnel sur un autre système. Chez *P.*

aeruginosa, la régulation par QS implique deux couples de gènes homologues de *luxR/I*, le système *lasR/I* et le système *rhlR/I* (Gambello & Iglewski, 1991; Latifi *et al.*, 1995; Passador *et al.*, 1993). Les systèmes *lasR/I* et *rhlR/I* s'expriment de manière hiérarchique de telle sorte que le système *lasR/I* exerce une régulation transcriptionnelle positive sur les gènes *rhlR* et *rhlI* (Latifi *et al.*, 1996). Dans ce cas, la production d'AHLs à partir de RhlI va donc dépendre en partie de l'expression en amont du système *lasR/I* et de la formation du complexe LasR/AHL.

1.2. Régulation du QS par des régulateurs transcriptionnels

1.2.1 Rôle des systèmes à deux composants

La production de molécules signal de type AHL peut également être modulée en fonction des modifications du milieu extracellulaire et indépendamment de la densité cellulaire. En effet, les bactéries utilisent des systèmes de phosphorylation appelés systèmes à deux composants pour percevoir les paramètres environnementaux et contrôler l'expression d'un répertoire de gènes adéquats. Le transfert de phosphate a lieu entre une protéine histidine kinase, réceptrice du stimulus environnemental, et un régulateur de réponse qui contrôle la transcription de gènes cibles. Chez de nombreuses espèces de *Pseudomonas* associées aux plantes, le système à deux composants GacS/GacA régule l'expression de nombreux phénotypes. Ce système régule positivement l'expression de *phzI* et de *ahII* qui sont des homologues de *luxI* respectivement caractérisés chez *P. aureofaciens*, bactérie phytobénéfique, et *P. syringae*, bactérie phytopathogène (Chancey *et al.*, 1999; Chatterjee *et al.*, 2003; Girard *et al.*, 2006; Marutani *et al.*, 2008). A ce jour, le signal perçu par la protéine réceptrice GacS n'a pas été identifié, c'est pourquoi le rôle de ce système dans la régulation du QS reste donc indéterminé.

Un autre système à deux composants, constitué de la protéine réceptrice du signal PprA et du régulateur de réponse PprB, est également impliqué dans la régulation du QS chez *P. aeruginosa* (Dong *et al.*, 2005a). En effet, l'inactivation du gène *PprB* réduit l'expression des gènes *lasI*, *rhlI* et *rhlR*, empêchant l'expression de fonctions régulées par QS, fonctions notamment impliquées dans la virulence et la mobilité de la bactérie. Des études complémentaires ont montré que ce système régulait positivement la production d'AHLs en modulant le transport actif dans la cellule des 3oxo,C₁₂-HSL synthétisées par LasI, ce qui influence la mise en place de la boucle d'autorégulation positive du gène *lasI* ainsi que l'expression du système *rhlI/rhlR* en partie régulée le complexe LasR/3oxo,C₁₂-HSL. Comme pour le système GacS/GacA, le signal perçu par PprA n'a pas encore été identifié.

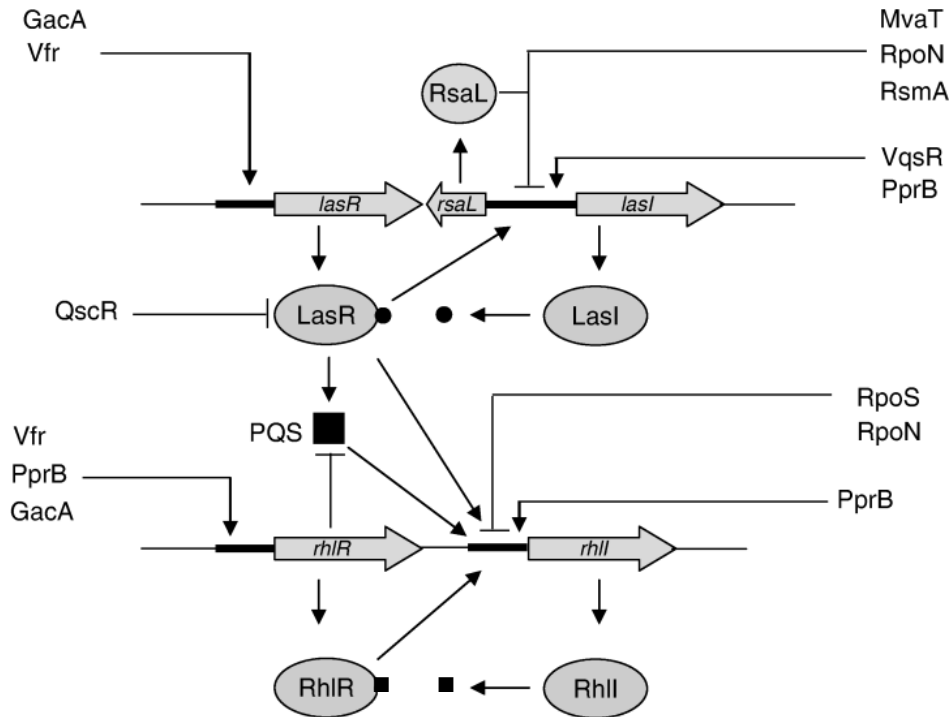


Figure 1.6 : Représentation du réseau de régulation des systèmes Las et Rhl chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Les système Las et Rhl régulent l'expression des facteurs de virulence extracellulaires, ainsi que la formation de biofilms chez *P. aeruginosa*; le système Las régule notamment la synthèse d'élastase; le système Rhl permet entre autre la synthèse des rhamnolipides. Le système Las se situe au sommet de la hiérarchie du réseau, régulant à la fois la production des molécules signal PQS (voir § 1.6) et l'expression du système Rhl. Ce système de QS est intégré dans un réseau de régulation complexe faisant intervenir diverses protéines régulatrices (GacA, Vfr, QscR, PprB, MvaT, RpoN, RsmA, VqsR, RpoS). Les flèches au-dessus des promoteurs des gènes (traits en gras) indiquent une régulation positive de l'expression des gènes alors que les traits fins parallèles à ceux des promoteurs indiquent une régulation négative. ● 3oxo, C₁₂-HSL, ■ C₄-HSL.

(Adapté de Venturi, 2006) .

1.2.2. Autres régulateurs transcriptionnels

Les réseaux de régulation du QS peuvent également intégrer une multitude de régulateurs transcriptionnels qui permettent de contrôler la production d'AHLs en fonction des paramètres physiologiques conditionnant la croissance de la bactérie. Chez *P. aeruginosa*, bactérie pour laquelle le processus de QS est très étudié, la régulation des deux systèmes de QS *las* et *rhl* implique un nombre important de régulateurs en plus des systèmes à deux composants décrits ci-dessus (**Figure 1.6**). Certains de ces régulateurs ont été caractérisés tels que : Vfr, homologue de Crp (« cyclic AMP receptor protein ») qui régule l'expression de gènes cibles en présence d'AMPC (Albus *et al.*, 1997; Beatson *et al.*, 2002) ; le facteur sigma RpoS, spécifique de la phase stationnaire (Schuster *et al.*, 2004) ; le facteur sigma alternatif RpoN (Heurlier *et al.*, 2003) ; la protéine de réponse au stress RelA (Erickson *et al.*, 2004; van Delden *et al.*, 2001) ; les régulateurs transcriptionnels RsaL (de Kievit *et al.*, 1999; Rampioni *et al.*, 2006; Rampioni *et al.*, 2007), et MvaT impliqué dans la régulation dépendante de la phase de croissance (Diggle *et al.*, 2002) ; le régulateur ANR impliqué dans le contrôle de la respiration anaérobie (Pessi & Haas, 2000) ; et VqsM, régulateur global de la famille AraC activant l'expression du gène codant le régulateur de transcription VqsR (Dong *et al.*, 2005b; Juhas *et al.*, 2004). Tous ces régulateurs influencent la production d'AHLs en fonction des conditions de croissance de la bactérie, et notamment en fonction de l'état trophique du milieu.

L'implication de nombreux régulateurs dans le contrôle du QS est également observée chez d'autres espèces de *Pseudomonas* ; chez *P. syringae*, PsrA, un facteur sigma alternatif, inhibe indirectement la transcription du gène *psyR*, homologue de *luxR*, empêchant l'activation de la boucle d'autorégulation du gène *psyI* et limitant donc la production d'AHLs (Chatterjee *et al.*, 2007). Cette répression est également observée chez *P. putida* WCS358, alors que chez *P. chlororaphis* PCL1391, PsrA régule positivement l'expression du système *phzI/phzR*, homologue de *luxI/luxR*, via le régulateur RpoS. Ces différentes études montrent que la régulation par QS dépend non seulement de l'espèce considérée mais certainement aussi des conditions environnementales dans lesquelles se développe cette espèce (Bertani & Venturi, 2004; Girard *et al.*, 2006). D'autres régulateurs peuvent également influencer la production d'AHLs chez d'autres genres bactériens ; par exemple le régulateur catabolique Crp active la synthèse d'AHLs chez *V. fischeri* en réponse à la présence de certains substrats dans le milieu (Dunlap & Greenberg, 1985; Dunlap & Greenberg, 1988; Dunlap, 1999).

Ces observations mettent en évidence la diversité des systèmes de régulation du QS chez les bactéries, notamment au sein du genre *Pseudomonas*. La régulation de l'expression

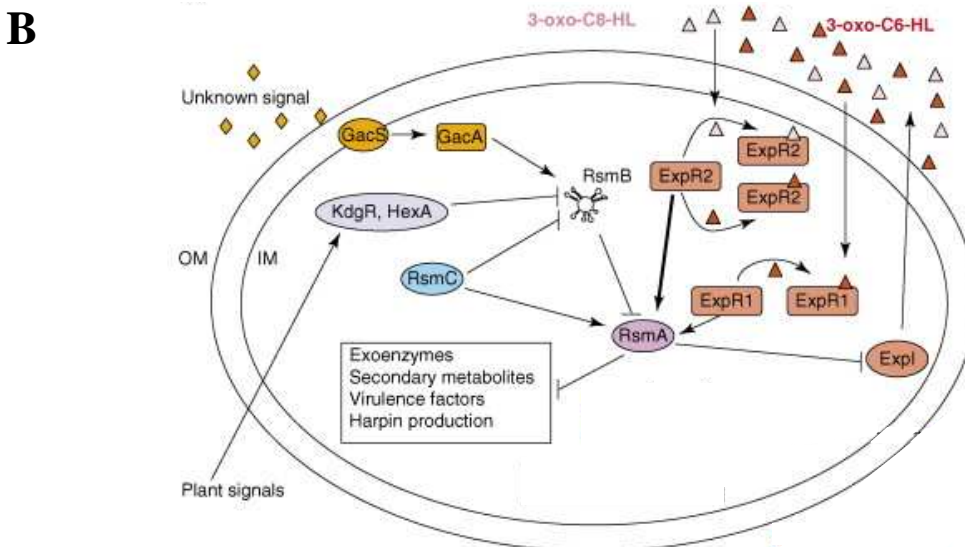
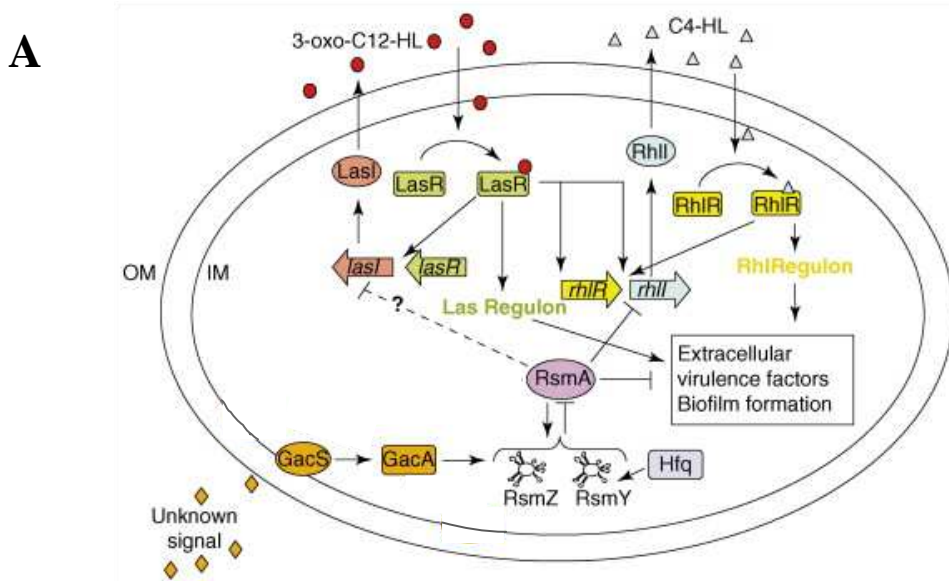


Figure 1.7 : Régulation post-transcriptionnelle du QS par le système GacS/GacA/Rsm chez *Pseudomonas aeruginosa* (A) et *Erwinia carotovora* (B).

GacS/GacA est un système à deux composants constitué de la protéine « senseur » GacS, qui une fois activée par un stimulus de nature indéterminée (losange orange), permet de transduire le signal en activant le régulateur de transcription GacA. (A) Chez *P. aeruginosa*, GacA activée peut induire l'expression des gènes *rsmZ* et *rsmY* codant des sRNAs, dont la structure permet de séquestrer le répresseur traductionnel RsmA et d'inhiber la fixation de cette protéine sur des ARNm. La séquestration de la protéine RsmA conduit à lever la répression traductionnelle de certains transcrits, notamment ceux synthétisés par le système Rhl et d'autres impliqués dans la synthèse de facteurs de virulence ou dans la formation de biofilms. (B) Chez *E. carotovora*, l'activation de GacA induit l'expression d'un seul gène codant un sRNA, RsmB, qui peut également séquestrer la protéine régulatrice RsmA. La séquestration de RsmA favorise la traduction des transcrits du gène codant l'AHL synthase ExpI et de transcrits impliqués dans la virulence. La protéine RsmC active la transcription de *rsmA* et inhibe celle de *rsmB*. (Adapté de Bejano-Sagie et Xavier, 2007)

des gènes responsables de la production d'AHLs est par conséquent intégrée dans un réseau global de régulation et ne dépend pas uniquement de la densité de population.

1.3. Régulation post-transcriptionnelle

L'expression des gènes impliqués dans la production d'AHLs peut aussi être régulée à un niveau post-transcriptionnel. Un des systèmes les plus étudiés, le système Rsm (*repressor of secondary metabolites*), implique d'une part la protéine RsmA, protéine capable de se complexer aux ARNm pour favoriser leur dégradation par des RNAses, et d'autre part de petits ARNs régulateurs non codants. Ces petits ARNs non-codants (sRNAs), autres que les ARNs ribosomiques ou les ARNs de transfert, apparaissent comme des régulateurs impliqués dans de nombreux procédés biologiques, affectant toutes les étapes de l'expression génétique. Chez les bactéries, les sRNAs régulent l'expression génétique soit en se fixant à des ARNm affectant ainsi leur stabilité ou leur traduction, soit en se fixant à des protéines régulatrices (de type RsmA) inhibant ainsi leur activité. Le système Rsm a été identifié chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* ainsi que chez *Erwinia carotovora* et semble fonctionner en partie sous la dépendance du système à deux composants GacS/GacA (Bejerano-Sagie & Xavier, 2007).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le régulateur GacA active l'expression de gènes dont certains transcrits sont des sRNAs, notamment RsmZ et RsmY (**Figure 1.7A**) (Kay *et al.*, 2006). RsmA, dont la synthèse est dépendante de la densité cellulaire, peut activer l'expression de *rsmZ* et *rsmY*, qui une fois transcrits, semblent agir de manière redondante car ils sont capables tous deux de séquestrer la protéine RsmA et de réprimer son activité. Ces différentes interactions moléculaires montrent l'existence d'une boucle d'autorégulation négative modulant l'activité de RsmA. RsmZ et RsmY sont également différenciellement régulés ; par exemple, RsmY est stabilisé en présence du régulateur global Hfq ce qui favorise son interaction avec RsmA. Par l'intermédiaire des sRNAs RsmZ et RsmY, l'activation de GacS/GacA entraîne donc l'inactivation de RsmA. Dans la situation inverse, RsmA peut interagir avec le transcrit de *rhII* et inhiber sa traduction, limitant donc la synthèse de C₄-HSL par RhII et également la régulation de l'expression des gènes dépendant du système *rhII/rhIR* (Pessi *et al.*, 2001). Le rôle inhibiteur de RsmA sur le deuxième système impliqué dans la production d'AHLs, le système *lasI/lasR*, n'a pas été mis en évidence de façon claire.

Ce système de régulation impliquant GacS/GacA/Rsm existe aussi chez plusieurs sous-espèces d'*Erwinia carotovora*, mais dans cette espèce le système à deux composants GacS/GacA régule la synthèse d'un seul sRNAs de type RsmB (**Figure 1.7B**) (Barnard & Salmond, 2007). Comme RsmZ et RsmY chez *P. aeruginosa*, RsmB peut inhiber l'activité régulatrice de RsmA en formant un complexe RsmB/RsmA. Chez *E. carotovora subsp.*

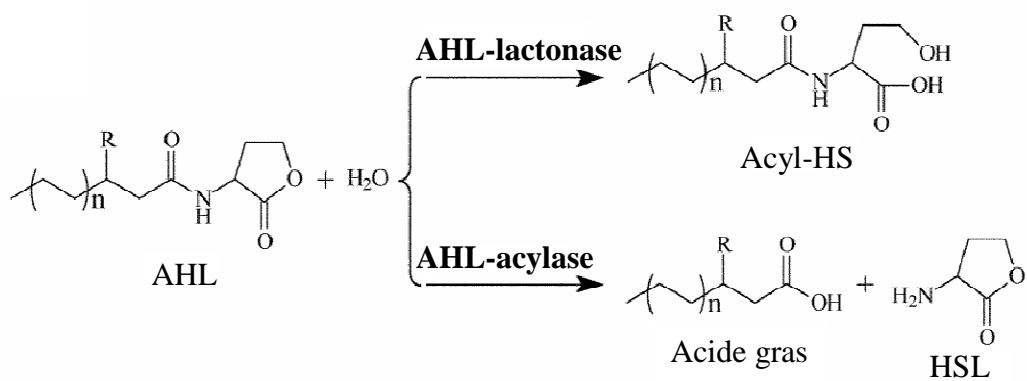


Figure 1.8 : Mécanismes enzymatiques de dégradation des AHLs.

Les enzymes appartenant à la famille des AHL-lactonases hydrolysent la liaison ester du noyau lactone des AHLs ce qui conduit à la formation de l'homosérine acylée (acyl-HS) correspondante. Les enzymes appartenant à la famille des AHL-acylases hydrolysent la liaison amide des AHLs, générant l'homosérine lactone (HSL) et l'acide gras correspondant.

carotovora, RsmA réprime l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de protéines extracellulaires, de métabolites secondaires et de facteurs de virulence (Johansson & Cossart, 2003; Newton & Fray, 2004). L'expression de ces fonctions fait également intervenir le QS, des signaux de la plante, et d'autres régulateurs, ce qui forme un réseau de régulation complexe. L'expression du gène *expI*, codant l'unique AHL synthase de cette bactérie, subit une régulation post-transcriptionnelle par la protéine RsmA. Deux homologues de LuxR, ExpR1 et ExpR2 (nommé aussi VirR), pouvant se complexer à ces AHLs, ont été identifiés (Burr *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006; Sjoblom *et al.*, 2006). Contrairement à la majorité des régulateurs de type LuxR qui sont actifs lorsqu'ils sont complexés aux AHLs, ExpR1 et ExpR2 activent l'expression de *rsmA* en absence d'AHLs. Cette régulation positive de *rsmA* peut être inhibée lorsque le complexe ExpR/AHL se forme, ce qui montre que l'expression de RsmA est réprimée par le QS chez *E. carotovora subsp. carotovora*. A densité cellulaire élevée, la transcription de *rsmA* n'est donc plus induite et l'ensemble des protéines RsmA restantes dans la cellule serait séquestrée par les petits ARNs régulateurs RsmB, désinhibant ainsi la traduction de *expI* et activant l'expression des facteurs de virulence.

Ces deux exemples démontrent que la cascade de régulation GacS/GacA/Rsm peut donc influencer la production d'AHLs à différents niveaux et s'intègre directement dans la régulation du QS lors du passage d'une faible densité de cellules à une densité élevée. Dans ce cas et certainement aussi d'une manière plus générale, la régulation via les sRNAs plutôt que par les protéines semble être plus avantageuse pour la bactérie pour induire une réponse cellulaire rapide ; en effet, le délai de synthèse et de dégradation des sRNAs est plus court que celui nécessaire pour la synthèse et la dégradation des protéines. Les petits ARN non codants semblent donc jouer un rôle très important dans la réactivité de réponse des réseaux de régulation du QS chez les bactéries.

1.4. Enzymes dégradatrices des AHLs

Deux familles d'enzymes bactériennes ayant une activité dégradatrice des AHLs ont été mises en évidence : la première regroupe les AHL-lactonases qui hydrolysent la liaison ester du cycle lactone des AHLs, la seconde regroupe les AHL-acylases qui hydrolysent la liaison amide des AHLs et libèrent ainsi la molécule d'homosérine lactone et l'acide gras correspondant (**Figure 1.8**). Initialement les AHL-lactonases et AHL-acylases ont été identifiées respectivement chez *Bacillus* sp. et *Variovorax paradoxus*, bactéries ne produisant pas naturellement des AHLs (**Tableau 1.1**) (Dong *et al.*, 2000; Leadbetter & Greenberg, 2000). Plus récemment, ces enzymes ont été mises en évidence chez des bactéries productrices d'AHLs appartenant aux genres *Agrobacterium* et *Pseudomonas*.

Tableau 1.1 : Bactéries dégradatrices d'AHLs identifiées à ce jour.

Activité enzymatique	Position taxonomique	Espèce	Gène	Référence	
Lactonase	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. IBN110	<i>ahlD</i>	Park <i>et al.</i> , 2003	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> spp., <i>R. erythropolis</i>	ND	Park <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Bacillii</i>	<i>Bacillus</i> sp 204B1, <i>Bacillus</i> COT1, <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i>	<i>aiiA</i>	Dong <i>et al.</i> , 2000, 2002, 2004 ; Lee <i>et al.</i> , 2002 ; Ulrich, 2004 ; Wang <i>et al.</i> , 2004a ; Pan <i>et al.</i> , 2008	
	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	<i>attM</i> <i>aiiB</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2002 Carlier <i>et al.</i> , 2003	
Acylase	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>aiiC</i>	Romero <i>et al.</i> , 2008	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i> sp. M664	<i>ahlM</i>	Park <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>R. erythropolis</i> W2	<i>qsda</i>	Uroz <i>et al.</i> , 2005	
	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i> XJ12B	<i>aiiD</i>	Lin <i>et al.</i> , 2003	
	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Variovorax paradoxus</i> VAI-C <i>P. aeruginosa</i> PAO1	ND <i>pvdQ</i> <i>quiP</i>	Leadbetter et Greenberg, 2000 Huang <i>et al.</i> , 2003 Huang <i>et al.</i> , 2006	
Inconnue	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter histidinolorans</i>	ND	Park <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp., <i>R. ruber</i>	ND	Jafra <i>et al.</i> , 2004, 2006 Park <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Bacillii</i>	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. circulans</i>	ND	Jafra <i>et al.</i> , 2004, 2006 d'Angelo-Picard <i>et al.</i> , 2005	
	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Bosea thiooxidans</i>	ND	d'Angelo-Picard <i>et al.</i> , 2005	
	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.	ND	Jafra <i>et al.</i> , 2004, 2006	
		<i>Burkholderia</i> HSL-4	ND	Yang <i>et al.</i> , 2005	
	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Commamonas</i> sp., <i>C. testosteroni</i>	ND	Uroz <i>et al.</i> , 2003 d'Angelo-Picard <i>et al.</i> , 2005	
		<i>Delftia acidovorans</i>	ND	Jafra <i>et al.</i> , 2004, 2006	
		<i>Ralstonia basilensis</i>	ND	Park <i>et al.</i> , 2006	
		<i>Variovorax</i> sp., <i>V. paradoxus</i>	ND	Uroz <i>et al.</i> , 2003 d'Angelo-Picard <i>et al.</i> , 2005	
		<i>Acinetobacter</i> sp. C1010, <i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. C1010,	ND	Kang <i>et al.</i> , 2004
			<i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. baumannii</i>	ND	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>Kluyvera</i> sp.	ND		Jafra <i>et al.</i> , 2004		
<i>Pantoea</i> sp.	ND		Jafra <i>et al.</i> , 2004		
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i>	ND	Uroz <i>et al.</i> , 2003 Jafra <i>et al.</i> , 2004, 2006 d'Angelo-Picard <i>et al.</i> , 2005			

ND : non déterminé

Chez *Agrobacterium tumefaciens*, le gène *attM* code une AHL-lactonase qui peut inactiver les 3oxo,C₈-HSL synthétisées par TraI, un homologue de LuxI. En condition de croissance exponentielle, la bactérie réprime l'expression du gène *attM* par le régulateur AttJ, permettant ainsi l'accumulation de 3oxo,C₈-HSL dans le milieu. Cette répression d'*attM* permet le transfert conjugatif du plasmide Ti, phénotype régulé par QS chez *A. tumefaciens*. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance, une inhibition du transfert du plasmide Ti est observée, et coïncide avec une diminution de concentration en AHLs dans la culture due à l'expression de l'AHL-lactonase AttM (Zhang *et al.*, 2002). Dans des conditions de carence nutritive, l'inactivation des AHLs permettrait d'économiser le coût énergétique important nécessaire pour la conjugaison, phénotype régulé par quorum-sensing. D'autre part, le gène *attM* peut être activé par l'acide γ -amino butyrique (GABA) qui est une molécule produite par de nombreux organismes, et notamment par la plante (Chevrot, 2006). Or, la synthèse de GABA augmente fortement lorsque la plante est blessée et pourrait donc stimuler l'inactivation des AHLs par AttM chez les cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* à proximité de la blessure. Le GABA produit par la plante pourrait donc moduler le transfert du plasmide Ti régulé par QS chez *A. tumefaciens*, et par conséquent affecter sa virulence sur les plantes. Deux autres enzymes homologues à des AHL-lactonases, AiiB et AiiC, ont été identifiées chez *A. tumefaciens*, mais l'activité dégradatrice des AHLs a seulement été mise en évidence pour AiiB (Carlier *et al.*, 2003).

Des activités AHL-acylase et AHL-lactonase ont été identifiées chez de nombreux isolats du sol appartenant au genre *Pseudomonas*, ainsi que chez *P. aeruginosa* PAO1 qui produit naturellement des AHLs de types 3oxo,C₁₂-HSL et C₄-HSL (Huang *et al.*, 2003). Notamment, l'enzyme PvdQ, homologue aux AHL-acylases, est capable de dégrader plus efficacement les AHLs à chaîne acyl longue que les AHLs à chaîne courte. En milieu riche, sa surexpression ne modifie pas la quantité de C₄-HSL produite mais empêche l'accumulation de 3oxo,C₁₂-HSL. Cependant, l'inactivation du gène *pvdQ* n'affecte pas la capacité de *P. aeruginosa* PAO1 à croître dans un milieu contenant des AHLs comme seule de carbone, suggérant l'existence d'autres enzymes dégradatrices d'AHLs. Un autre gène homologue à *pvdQ*, nommé *quiP*, code également une AHL-acylase dégradant spécifiquement les AHLs à chaîne longue chez *P. aeruginosa* ; cependant ses conditions d'expression et son rôle restent à déterminer (Huang *et al.*, 2006). Ces AHL-acylases spécifiques des AHLs à longue chaîne permettraient à la bactérie de moduler la proportion des deux types d'AHLs synthétisées, afin de réguler finement l'expression des gènes étant sous leur contrôle respectif.

Ces AHL-lactonases et AHLs-acylases endogènes sont impliquées dans la régulation du QS car elles accélèrent le turnover et la dégradation des AHLs produites dans la cellule.

Même si ces enzymes semblent utiliser spécifiquement les molécules de type AHLs comme substrat, elles peuvent également être impliquées dans d'autres voies métaboliques. Chez *A. tumefaciens*, *attM* fait partie d'un opéron contenant deux autres gènes, *attK* et *attL* ; ces trois gènes codant des enzymes impliquées dans le catabolisme des gamma-butyrolactones (GBL), notamment le GABA, et dont les produits de dégradation sont utilisés dans le cycle des acides tricarboxyliques (Carlier *et al.*, 2004; Chevrot, 2006). De plus, ces GBL activent la transcription de l'opéron *attKLM*. Chez *P. aeruginosa*, le gène *pvdQ* semble être aussi impliqué dans la voie de biosynthèse de la pyoverdine, un sidérophore fluorescent impliqué dans l'acquisition du fer (Lamont & Martin, 2003; Ochsner *et al.*, 2002). Ces différentes observations suggèrent que ces enzymes sont bifonctionnelles et que leur activité n'est pas uniquement liée à la dégradation des AHLs (Roche *et al.*, 2004). Des études complémentaires seraient nécessaires pour éclaircir le rôle de ces enzymes dégradatrices d'AHLs produites par des bactéries étant aussi capables de synthétiser ces molécules signal.

1.5. Diffusion/Transport des AHLs à travers la membrane

La chaîne d'acide gras hydrophobe et le noyau homosérine lactone hydrophile confèrent aux AHLs des propriétés amphipatiques leur permettant de traverser la membrane plasmique des bactéries (Kaplan & Greenberg, 1985; Pearson *et al.*, 1999). Ces molécules diffusent ainsi librement suivant le gradient d'AHLs de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, et inversement. Cette diffusion passive des AHLs a été montrée en marquant radioactivement les 3oxo,C₆-HSL produites par *Vibrio fischeri* (Kaplan & Greenberg, 1985). Cependant la vitesse de diffusion peut varier en fonction de la nature de l'AHL considérée. En effet, le niveau d'hydrophobicité des AHLs est particulièrement affecté par la longueur de la chaîne acyle mais aussi par le nombre d'insaturations qu'elle comporte et par la nature de la substitution au niveau du carbone en position 3. Par conséquent, les chaînes acyles longues confèrent aux AHLs une hydrophobicité plus grande que les chaînes courtes, et diminuent donc leur vitesse de diffusion à travers la membrane.

Chez *P. aeruginosa*, un transport actif des 3oxo,C₁₂-HSL a été mis en évidence alors que les C₄-HSL synthétisées diffusent librement à travers la membrane cellulaire (Pearson *et al.*, 1999). Il permet la translocation des 3oxo,C₁₂-HSL, qui sont des AHLs à chaînes longues et donc plus hydrophobes que les C₄-HSL, via une pompe de type transporteurs d'antibiotiques codée par l'opéron *mexAB-oprM*. Lorsque cette pompe n'est pas synthétisée, la concentration d'AHLs présente dans le cytoplasme est plus importante que celle mesurée dans le milieu extracellulaire. De plus, une autre pompe, codée par l'opéron *mexGHI-opmD*, semble jouer un rôle dans le QS chez *P. aeruginosa* ; une diminution de la production d'AHLs

associée à une diminution de la virulence de la bactérie est en effet observée lorsque *mexGHI-opmD* est inactivé (Aendekerk *et al.*, 2002). *B. pseudomallei*, une autre bactérie pathogène de l'homme, peut produire jusqu'à six AHLs différentes, la souche KHW produisant à la fois des C₈-HSL, 3OH,C₈-HSL, C₁₀-HSL, 3OH,C₁₀-HSL, 3oxo,C₁₀-HSL et 3oxo,C₁₄-HSL (Chan & Chua, 2005; Chan *et al.*, 2007). Il a été montré chez cette souche que les AHLs produites activaient la transcription des gènes *bpeAB-oprB*. Ces gènes codent des protéines formant une pompe à efflux dont la fonction est de sécréter l'ensemble des AHLs produites par cette bactérie ; en revanche elle ne semble pas impliquée dans l'import des AHLs dans le cytoplasme. Lorsque cette pompe est non fonctionnelle, aucune AHL n'est détectée dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne l'absence d'expression des phénotypes régulés par QS et notamment ceux impliqués dans la virulence de la bactérie (Chan & Chua, 2005). Pour l'instant, aucun système impliqué dans l'importation des AHLs dans la cellule n'a été mis en évidence chez les bactéries.

Ce transport actif des AHLs n'a été mis en évidence que chez *P. aeruginosa* et *B. pseudomallei* ; le fait qu'un nombre important de bactéries produit des AHLs à chaînes acyles longues suggère que le transport des AHLs via des pompes à efflux est probablement aussi présent chez d'autres bactéries (Marketon *et al.*, 2002; Schaefer *et al.*, 2002). Avec ce type de transporteurs, des AHLs de nature différente produites par une même bactérie peuvent s'accumuler différemment dans le milieu extra et intracellulaire ; ainsi le seuil de concentration d'AHLs nécessaire pour réguler les phénotypes dépendant du QS dépendra non seulement du nombre mais aussi de la nature des AHLs synthétisées (Newton & Fray, 2004).

1.6. Régulation de la production d'AHLs par d'autres molécules signal endogènes

Les bactéries à Gram négatif peuvent produire d'autres molécules signal que les AHLs. Une même bactérie pouvant produire plusieurs types de molécules signal, la synthèse d'AHLs peut également être régulée par la production et la perception d'autres types de molécules signal. Ainsi *P. aeruginosa* produit des 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolones appelées PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) dont la synthèse est observée après la phase exponentielle de croissance et dépend de LasR/3oxo,C₁₂-HSL (Pesci *et al.*, 1999). L'addition de PQS exogène active l'expression du gène responsable de la synthèse de C₄-HSL, et par conséquent l'expression des gènes régulés par le système Rhl pendant la phase stationnaire. En retour, la présence de C₄-HSL influencerait négativement la production de PQS (McGrath *et al.*, 2004), mais il n'a pas été montré si ce contrôle était direct ou indirect (Wade *et al.*, 2005). Ces différents résultats montrent que la synthèse d'AHLs résulte d'une cascade de régulation hiérarchique dans la cellule dans laquelle interviennent les signaux de type PQS.

Ce réseau de régulation du QS, dépendant à la fois des molécules signal de type AHLs et PQS, joue un rôle central pour coordonner la virulence, la résistance aux antibiotiques et la fitness chez *P. aeruginosa*.

En plus des molécules de type AHLs et de type PQS, *P. aeruginosa* peut produire des dipeptides cycliques (DKP ou diketopiperazines) qui agiraient également comme des molécules signal (Holden *et al.*, 1999). Ces molécules seraient capables d'interférer dans le processus de signalisation basé sur les systèmes de type *luxR/luxI*, en entrant en compétition avec les AHLs au niveau de leur site de liaison aux protéines de type LuxR. De cette manière, les DKP pourraient inhiber la boucle d'autorégulation des gènes de type *luxI* (c.a.d. *lasI* et *rhlI*) et ainsi jouer un rôle sur l'accumulation des AHLs ; cependant l'origine et les fonctions physiologiques précises de ces DKP restent à déterminer.

Chez *R. solanacearum*, la communication cellulaire est intégrée dans un réseau de régulation complexe permettant l'induction d'un ensemble de gènes impliqués dans la virulence de la bactérie *in planta*, notamment en fonction des signaux de la plante et des carences nutritionnelles. Cette bactérie synthétise une molécule signal volatile, l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxypalmitique (3-OH-PAME), qui s'accumule au cours de la croissance bactérienne (Flavier *et al.*, 1997a). A densité cellulaire élevée, le 3-OH-PAME permet l'expression du régulateur transcriptionnel PhcA qui, en présence du facteur sigma RpoS et d'autres régulateurs, va induire l'expression des facteurs de virulence ainsi que la synthèse d'AHLs (Flavier *et al.*, 1997b; Flavier *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998). Une boucle d'autoinduction du gène *soli*, homologue de *luxI*, via les AHLs a été mise en évidence ; cependant la nature du régulon dépendant du QS via les AHLs reste à déterminer chez *R. solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997b).

Les furanosyl borate diesters, appelés aussi AI-2, sont des molécules signal qui ont été découvertes chez de nombreuses bactéries aussi bien Gram négatives que positives. Il a été proposé que ces molécules signal seraient un moyen de communication inter-espèces. AI-2 a été mis en évidence chez *Vibrio fischeri* où elle est synthétisée de manière constitutive et s'accumule dans le milieu extracellulaire (Lupp & Ruby, 2004). Cette molécule participerait, conjointement aux C₈-HSL synthétisées par AinS, à la régulation des gènes impliqués dans l'émission de bioluminescence et dans la colonisation du milieu par cette bactérie. Un modèle de régulation du QS a été proposé et montre que la production d'AI-2 favorise, de manière indirecte, la synthèse de C₈-HSL via l'expression du gène *ainS* (Lupp & Ruby, 2004).

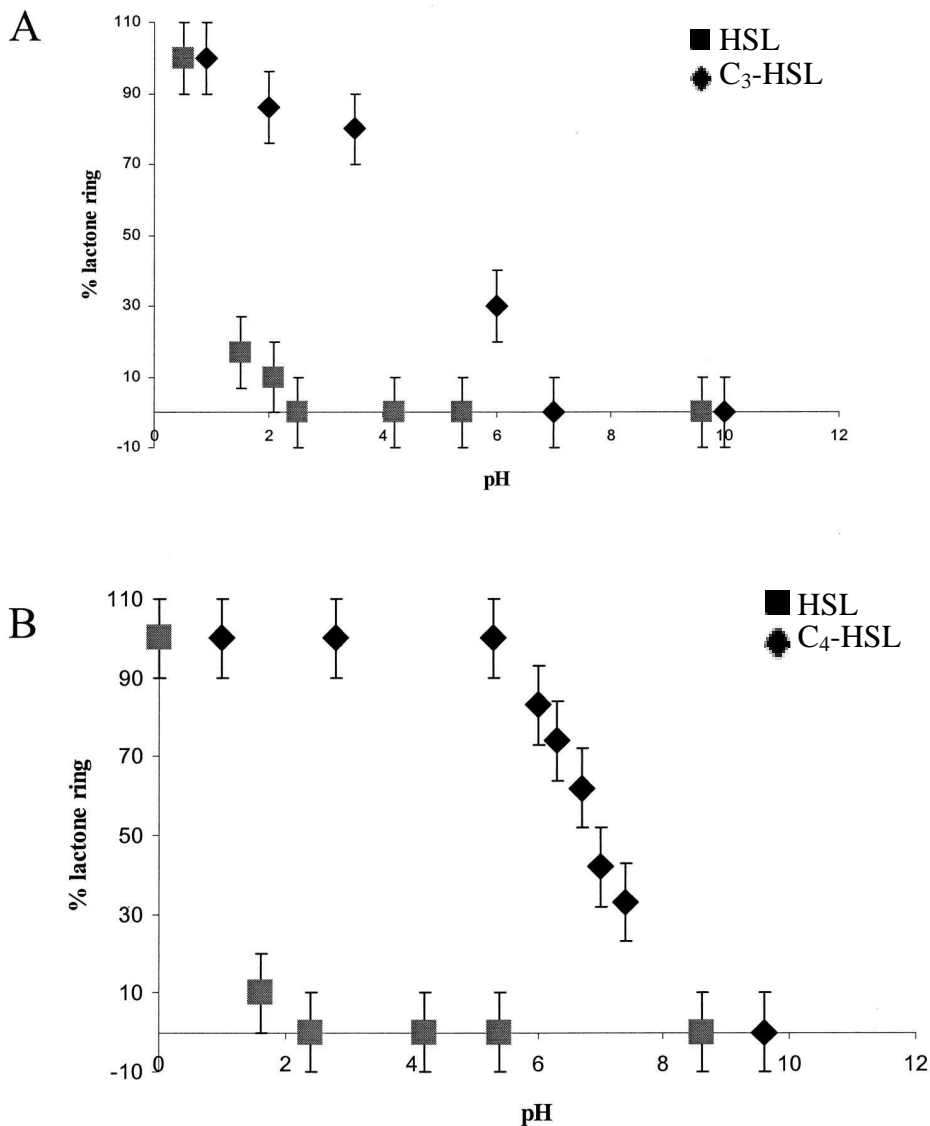


Figure 1.9 : Stabilité du noyau lactone des HSL, C₃-HSL et C₄-HSL en fonction du pH. Graphiques représentant la proportion de noyaux lactones des homosérines lactones (HSL) (A et B), des *N*-propionyl-homosérine lactones (C₃-HSL) (A), et des *N*-butanoyl-homosérine lactones (C₄-HSL) (B), persistant dans le milieu en fonction du pH. Ces résultats montrent que le noyau lactone des molécules de C₄-HSL est plus résistant à l'hydrolyse alcaline que celui des molécules de C₃-HSL. (D'après Yates *et al.*, 2002)

2. Paramètres environnementaux influençant la production, la stabilité et la dégradation des molécules signal de type AHL

2.1. Effets des facteurs abiotiques sur le QS

2.1.1. Effets du pH et de la température

Le pH et la température sont des paramètres du milieu qui affectent la demi-vie des AHLs. En effet, des conditions de pH alcalin et de température élevée favorisent l'hydrolyse du cycle lactone des AHLs, ce qui produit un composé de type *N*-acyl-homosérine qui est inactif en tant que molécule signal. Alors que 70% des molécules de *N*-propionyl-homosérine lactone (C₃-HSL) sont hydrolysées à un pH égal à 6, les C₄-HSL ne sont complètement hydrolysées qu'à pH 8 (**Figure 1.9**) (Yates *et al.*, 2002). En conséquence, les AHLs doivent comporter une chaîne acyle contenant au minimum quatre atomes de carbone pour rester suffisamment stables, et donc actives sous forme de molécules signal dans les conditions de pH dans lesquelles se développent la plupart des bactéries. Il a également été mis en évidence que les AHLs à chaîne acyles longues sont moins sensibles à l'hydrolyse alcaline et à des températures élevées que les AHLs à chaînes acyles courtes.

Lorsqu'un milieu riche est utilisé pour cultiver *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, il devient alcalin à partir de la phase stationnaire de croissance de la bactérie et entraîne à la fois une inactivation des 3oxo,C₆-HSL et une diminution de production de carbapénème dont la synthèse dépend du QS. Cette alcalinisation de la culture en milieu riche semble être liée à la production d'ammoniac suite à l'utilisation des peptides du milieu comme sources de carbone et d'énergie. Cependant, si le milieu est tamponné à pH neutre, la 3oxo,C₆-HSL et le carbapénème sont à nouveau détectés pendant la phase stationnaire à température de croissance optimale (30°C) mais demeurent à une concentration faible à température plus élevée (>37°C) (Byers *et al.*, 2002; McGowan *et al.*, 2005). Une des réponses de la plante à une infection par *E. carotovora* est d'alcaliniser la zone d'infection grâce à l'activation de pompes à protons. La perturbation du QS d'*E. carotovora* due à l'inactivation des AHLs par un pH alcalin semblerait donc constituer une réaction de défense de la plante vis à vis de la bactérie phytopathogène.

L'inactivation des AHLs en phase stationnaire due à l'alcalinisation du milieu a également été mise en évidence chez *P. aeruginosa* et *Y. pseudotuberculosis* (Yates *et al.*, 2002). Chez *P. aeruginosa*, les 3oxo,C₁₂-HSL produites semblent plus stables que les C₄-HSL en milieu alcalin, ce qui illustre la stabilité différentielle des AHLs en milieu alcalin en fonction de la longueur de la chaîne acyle (Yates *et al.*, 2002).

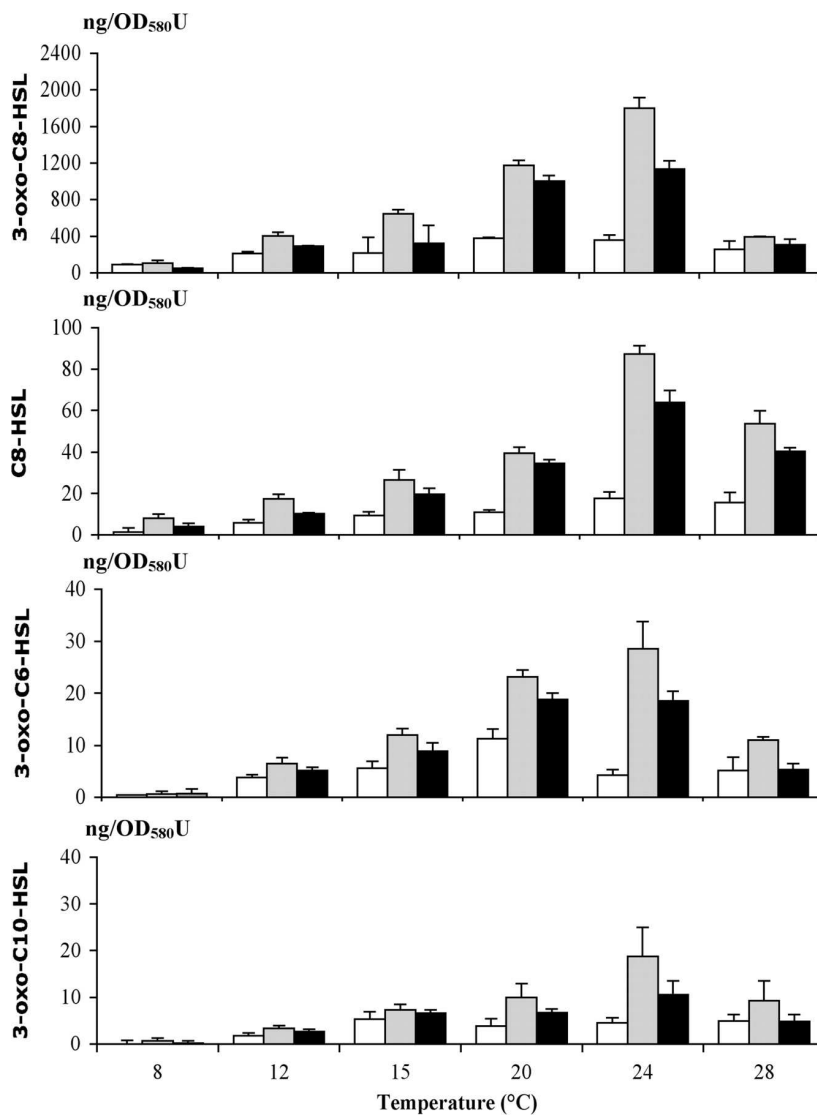


Figure 1.10 : Effet de la température sur la cinétique de production d’AHLs par *Pectobacterium atrosepticum* 6276.

Les quantités de chaque AHL produite par *P. atrosepticum* 6276 ont été déterminées au milieu (bâtonnets blancs) et à la fin de la phase exponentielle de croissance (bâtonnet gris), et en phase stationnaire (bâtonnets noirs) à partir de cultures réalisées à six températures différentes (8°C, 12°C, 15°C, 20°C, 24°C, 28°C). La quantité d’AHLs produite est influencée négativement par des températures inférieures ou supérieures à 24°C, température optimale de croissance de cette bactérie. OD₅₈₀U, unité de densité optique mesurée à 580 nm.

(D’après Latour *et al.*, 2007)

P. atrosepticum 6276, bactérie psychrotolérante dont l'optimum de température de croissance se situe à 24°C, synthétise quatre AHLs. Cependant la quantité d'AHLs produite est influencée négativement par des températures de culture inférieures ou supérieures à 24°C (**Figure 1.10**) (Latour *et al.*, 2007). Le mécanisme impliqué dans la thermorégulation de la synthèse d'AHLs n'est pas vraiment identifié, mais la diminution de synthèse des AHLs lorsque la température de la culture diminue, semble coïncider avec une diminution de la quantité de transcrits *expI* (homologue de *luxI*), ce qui suggère une régulation au niveau transcriptionnel. La thermorégulation de la synthèse des AHLs indépendamment de la densité cellulaire a été également observé chez le pathogène opportuniste *Aeromonas hydrophila* lorsque la bactérie est cultivée à des températures inférieures (12°C) ou supérieures (37°C) à sa température optimale de croissance, 30°C (Medina-Martinez *et al.*, 2006).

La vitesse de renouvellement et d'accumulation des AHLs au sein de la population dépend donc non seulement des paramètres physico-chimiques du milieu mais aussi de la nature de l'AHL considérée. Ces différents travaux montrent que le seuil de concentration d'AHLs nécessaire pour réguler les fonctions régulées par QS au sein de la population peut être fortement influencé par les conditions locales de pH et de température.

2.1.2. Effets de la composition du milieu

La composition du milieu dans lequel se développent les bactéries a également une influence sur la régulation du QS. En effet, les conditions de carence en certains nutriments peuvent agir sur la production d'AHLs et sur l'expression des phénotypes régulés par QS. Chez *E. carotovora* subsp. *carotovora*, la transcription du gène *expI* permettant la synthèse de 3oxo,C₆-HSL dépend fortement de la source de carbone disponible dans le milieu de culture. Par exemple, la croissance de cette bactérie dans un milieu minimum contenant du glycérol entraîne une réduction de 50% du taux de transcription du gène *expI* par rapport au taux de transcription détecté en milieu minimum supplémenté en glucose (McGowan *et al.*, 2005). Chez *A. hydrophila*, la synthèse de C₄-HSL est induite par une carence en glucose dans le milieu de culture (Medina-Martinez *et al.*, 2006). Le QS chez cette bactérie régulerait la production d'exoprotéases et permettrait ainsi d'utiliser une autre source de carbone que le glucose lorsque le milieu de culture s'appauvrit en nutriments (Swift *et al.*, 1999). Les mécanismes précis permettant à ces bactéries de moduler la production d'AHLs en fonction de la source de carbone disponible ne sont pas connus.

Chez *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bactérie capable d'établir une symbiose avec des plantes légumineuses, quatre gènes codant des AHLs synthèses ont été identifiés et permettent la synthèse d'AHLs de différente nature ; la quantité et le ratio de chaque AHL synthétisée

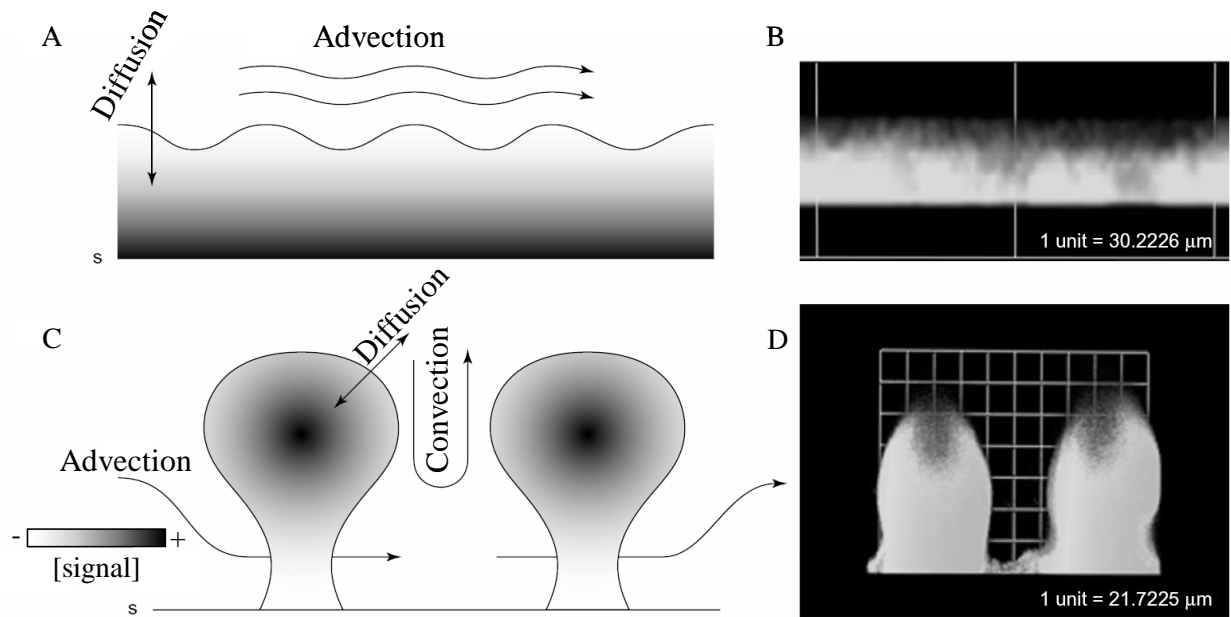


Figure 1.11 : Représentation schématique de l'influence des transferts de masse sur la concentration de molécules signal au sein de biofilms.

Les phénomènes d'advection, de convection et de diffusion affectent la concentration de molécules signal au sein de biofilms plats (ou non structurés) (A, B) et structurés (C, D). Un gradient décroissant de concentration de molécules signal (représenté par des intensités différentes de niveau de gris) existe probablement de l'intérieur vers l'extérieur de ces deux types de biofilms schématisés en coupe transversale en A et C. Les photos B et D réalisées à partir d'observations de microscopie confocale montrent respectivement des coupes transversales de biofilms plats et structurés formés par *P. aeruginosa* PAO1. s, surface biotique ou abiotique sur laquelle se forme le biofilm.

(Adapté de Parsek et Greenberg, 2005)

varient en fonction de la richesse du milieu de culture (Lithgow *et al.*, 2001). L'influence des conditions environnementales sur la régulation par QS chez *P. aeruginosa*, a été étudiée via le suivi de l'expression des systèmes *las* et *rhl* dans 46 milieux de culture différents (Duan & Surette, 2007) ; cette étude montre que l'expression de ces deux systèmes varient de manière significative en fonction du type de milieu considéré et ne semble pas corrélée à la densité cellulaire. Ces observations contrastent avec l'idée d'une cascade de régulation hiérarchique entre les deux systèmes qui serait uniquement activée à forte concentration cellulaire. De plus, l'expression des gènes codant les AHLs synthases ne semble pas toujours corrélée à l'expression des gènes codant les régulateurs de transcription correspondants, ce qui suggère également que ces différents gènes sont indépendamment régulés. Les régulateurs de transcription de type LuxR et leurs AHLs correspondantes pourraient donc jouer différents rôles dans les différentes conditions de culture testées.

La production d'AHLs peut également être modulée par la pression en oxygène et par une carence en fer (Newton & Fray, 2004). Chez *P. aeruginosa*, le niveau de transcription du gène *lasI* est plus important lorsque la bactérie est cultivée en milieu riche en condition d'anaérobiose, alors que la transcription de *rhlI* est réprimée dans ces mêmes conditions (Wagner *et al.*, 2003). Cette régulation différentielle des gènes *lasI* et *rhlI* en fonction des conditions d'oxygénation du milieu n'a pas lieu lorsque les bactéries sont cultivées en milieu minimum (Duan & Surette, 2007). La synthèse de chaque AHL peut donc être modulée en fonction de la composition du milieu.

2.1.3. Effets des transferts de masse

Les transferts de masse regroupent l'ensemble des processus par lesquels les molécules sont transportées dans un système. Parmi ces processus, la diffusion et l'advection peuvent influencer le niveau d'accumulation des AHLs produites par les bactéries dans leur environnement et jouer ainsi un rôle important au niveau du QS (**Figure 1.11**).

2.1.3.1. Rôle du processus de diffusion

Le phénomène de diffusion permet aux AHLs de migrer dans le milieu extracellulaire en fonction de leur gradient de concentration. Le nombre de cellules nécessaire pour atteindre un seuil de concentration d'AHLs induisant une réponse physiologique, pourra varier considérablement en fonction du taux de diffusion des AHLs dans le milieu, ce taux pouvant lui-même varier fortement à l'échelle microscopique. Outre le fait que la diffusion d'une AHL dépende de sa propre nature, l'hydrophobicité du milieu dans lequel se développent les bactéries peut également affecter les propriétés de diffusion d'une AHL. Plusieurs espèces

bactériennes produisant des AHLs sont aussi capables de synthétiser et de sécréter dans le milieu des polysaccharides (Kolter & Greenberg, 2006). Ces exopolysaccharides constituent la matrice des biofilms dont le développement dépend du QS chez certaines bactéries. Dans un biofilm formé par *P. aeruginosa*, la matrice constituée d'exopolysaccharides particulièrement hydrophobes semble limiter la diffusion des AHLs car la concentration des 3oxo,C₁₂-HSL est plus importante dans le biofilm que dans le fluide circulant à sa surface (Charlton *et al.*, 2000). Cette matrice pourrait interagir chimiquement avec les AHLs et dans une certaine mesure pourrait aussi les séquestrer, rendant ces molécules signal indisponibles pour les bactéries du biofilm (Parsek & Greenberg, 2005). Comparativement aux 3oxo,C₁₂-HSL, les C₄-HSL sont moins hydrophobes et réagissent donc plus faiblement avec la matrice du biofilm. Dans ce cas, les C₄-HSL seraient majoritairement responsables du processus de signalisation, ce qui expliquerait que cette molécule soit produite en quantité plus importante que la 3oxo,C₁₂-HSL dans des biofilms formés par *P. aeruginosa* (Singh *et al.*, 2000).

En complément de leur rôle dans la perception de la densité cellulaire, les AHLs pourraient aussi informer les cellules sur le taux de diffusion des molécules secrétées dans un environnement donné (Redfield, 2002). Les bactéries peuvent réguler via le QS la synthèse et la sécrétion de sidérophores, d'antibiotiques, de surfactants, d'enzymes et d'autres métabolites secondaires, qui n'agissent de manière efficace pour la bactérie uniquement lorsque la diffusion au sein de l'environnement cellulaire est limitée. En régulant la production de ces molécules en fonction du taux de diffusion des AHLs dans le milieu, les bactéries pourraient ainsi minimiser les pertes énergétiques dues à la biosynthèse de ces métabolites.

2.1.3.2. Rôle du processus d'advection

Les AHLs peuvent également être transportées dans le milieu naturel par des fluides circulants, un phénomène nommé advection. L'impact de ce processus sur l'accumulation des AHLs dépend de l'environnement considéré, mais pourra avoir comme conséquence de lessiver le signal et de le diluer dans le milieu où se développe la population bactérienne (Horswill *et al.*, 2007). Ce facteur physique du milieu peut jouer un rôle important au niveau de l'environnement bactérien local, notamment lorsque les bactéries forment une structure de type biofilm dont la surface est soumise à un flux de liquide circulant. Chez *P. aeruginosa*, la vitesse du flux du liquide circulant intervient de manière significative dans la maturation du biofilm dont la structure dépend de fonctions régulées par QS (Purevdorj *et al.*, 2002). L'accumulation des AHLs serait plus importante à l'intérieur du biofilm qu'en périphérie (lorsque celui-ci est soumis à un flux du liquide circulant), ce qui entraînerait une induction

précoce des phénotypes régulés par le QS pour les cellules situées à l'intérieur du biofilm par rapport à celles situées à l'extérieur (de Kievit *et al.*, 2001). Chez le phytopathogène *P. syringae* pv. *syringae*, le QS régule certaines fonctions impliquées dans la virulence et la survie de la bactérie. Son mode de vie épiphyte est caractérisé par un regroupement des cellules, formant des agrégats de différentes tailles à la surface des feuilles de la plante. Il a été montré que l'accumulation des AHLs au sein de ces agrégats était favorisée lorsque l'humidité à la surface des feuilles était réduite, ce qui suggère une influence de l'humidité sur la diffusion des AHLs hors des agrégats (Dulla & Lindow, 2008). Les eaux de pluies qui s'écoulent à la surface des feuilles peuvent donc perturber la communication cellulaire de la microflore bactérienne épiphyte. A ce jour, peu d'études ont estimé l'effet des paramètres hydrodynamiques sur la régulation du QS dans les communautés structurées.

2.2. Effets des facteurs biotiques sur le QS

2.2.1. Effet de la population bactérienne

2.2.1.1. Rôle de la densité cellulaire

La première fonction attribuée aux molécules signal impliquées dans le phénomène de QS serait d'estimer la densité de population dans laquelle se trouvent les cellules produisant ces molécules signal. La densité de population est déterminée d'une part par le nombre de cellules influencé par la croissance bactérienne et d'autre part par le volume de l'espace disponible pour la croissance. Cependant, ces deux variables peuvent varier indépendamment, la densité de la population augmentant lorsque le volume de l'environnement disponible pour la croissance des bactéries reste confiné ou lorsque le volume de cet environnement se réduit avec un nombre de cellules constant. La concentration de molécule signal peut augmenter de la même manière, et à partir d'un certain seuil, permettra de synchroniser l'expression d'un ensemble de gènes au niveau de la population. Chez certaines bactéries, ce phénomène est amplifié par une boucle d'autorégulation positive de la production d'AHLs lorsque le seuil de concentration d'AHLs dans le milieu est atteint. La densité de population semble donc être un facteur déterminant dans l'induction des phénotypes régulés par QS via les AHLs.

Chez plusieurs espèces bactériennes, la régulation de certains gènes via le QS uniquement lorsque la population atteint un certain « quorum » de cellules semble être bénéfique pour les interactions de la bactérie avec son environnement. *Vibrio fischeri* est capable d'établir une symbiose avec de nombreux eucaryotes marins et est capable de coloniser un organe lumineux du calamar *Euprymna scolopes* à très haute densité cellulaire (10^{10} cellules par ml). La lumière qui est émise par *V. fischeri* à forte densité cellulaire dépend de l'accumulation des AHLs synthétisées par la bactérie dans l'organe lumineux qui

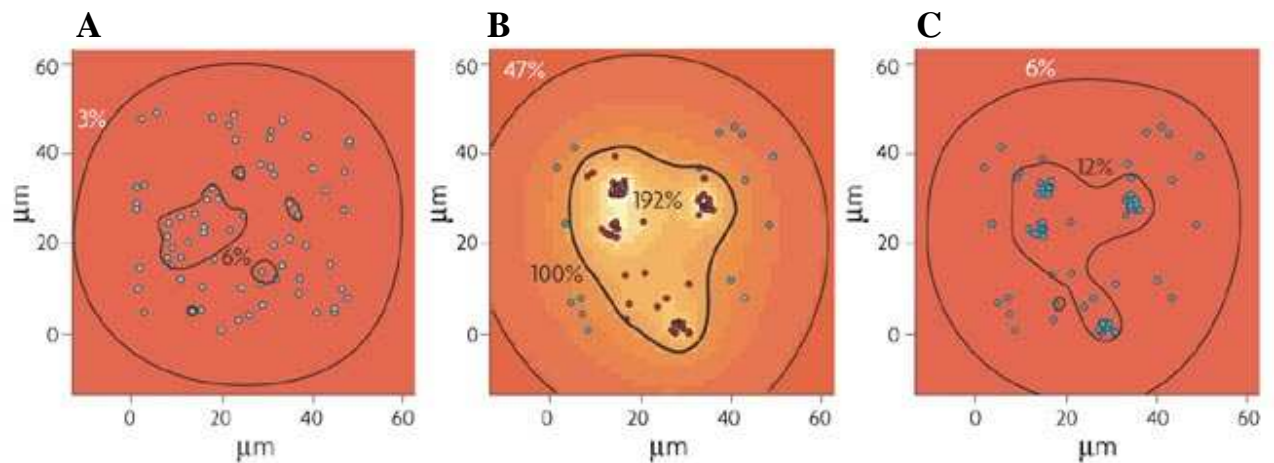


Figure 1.12 : Modélisation de l'effet de la distribution spatiale des cellules bactériennes sur la production de molécules signal.

Ce modèle mathématique permet d'évaluer la concentration de molécules signal produite localement par des bactéries (points bleus ou rouges) distribuées aléatoirement (A) ou en amas (B). Ce modèle est utilisé avec un volume déterminé et un nombre de cellules constant et prend en compte différents paramètres tels que le taux de diffusion des AHLs, le taux de production des AHLs, et la présence (B) ou non (C) d'une autorégulation de la production des AHLs. Le dégradé de couleur rouge à blanc symbolise une augmentation croissante de concentration de molécule signal. Les lignes noires indiquent des pourcentages de concentration de molécules signal par rapport à la concentration seuil nécessaire pour induire les phénotypes régulés par QS. Lorsque ce seuil est atteint ou dépassé ($\% \geq 100\%$) dans l'environnement bactérien, les phénotypes régulés par le QS sont donc induits et les cellules sont représentées en rouge ; elles sont colorées en bleu dans le cas inverse. Le seuil de concentration d'AHLs nécessaire pour induire les fonctions régulées par QS est atteint uniquement lorsque les cellules sont regroupées en amas et lorsque la boucle d'autorégulation existe (B).

(D'après Hense *et al.*, 2007)

constitue un espace clos. *V. fischeri* fournit de la lumière à son hôte nocturne, et permet à ce dernier d'échapper à ces prédateurs. En retour, le calamar offre à la bactérie un environnement riche en nutriments. Si l'organe lumineux était de taille plus réduite, une concentration plus faible de cellules serait requise pour atteindre une concentration seuil en AHLs, mais la quantité de lumière émise serait probablement insuffisante pour que le calamar échappe à ses prédateurs. Des travaux récents de modélisation du QS chez *V. fischeri* ont permis de mettre en évidence que les niveaux de bioluminescence mesurés étaient différents si les bactéries étaient cultivées soit sous forme planctonique soit adhérentes à une surface (Parent *et al.*, 2008). Dans ces conditions, il a été montré que la taille de la population, sa densité, et le temps de diffusion de signal entre les cellules, étaient des paramètres qui affectaient directement le QS.

2.2.1.2. Rôle de la répartition spatiale des cellules

Le concept de QS provient d'études menées sur des populations clonales, souvent obtenues à partir de cultures liquides homogènes. Cependant, ces conditions d'étude ne reflètent pas les milieux naturels où les populations sont confrontées à des environnements hétérogènes qui fluctuent dans le temps. Il est donc probable que dans des environnements complexes tels que la rhizosphère, la distribution spatiale des cellules ne soit pas homogène, mais que ces cellules soient isolées ou regroupées en amas de taille variable et localisées dans des espaces où les taux de diffusion et la disponibilité en nutriments fluctuent également (Hense *et al.*, 2007).

Des travaux de modélisation mathématique montrent que la concentration de molécules signal dans l'environnement immédiat de la cellule dépend encore plus directement de la distribution spatiale des cellules produisant des molécules signal que de leur densité (**Figure 1.12**) (Hense *et al.*, 2007). Ce modèle, utilisé avec un volume et un nombre fixe de cellules, prend en compte différents paramètres tels que le taux de diffusion des AHLs, le taux de production des AHLs, la présence d'une autorégulation de la production des AHLs et la distribution spatiale des cellules. Le seuil de concentration d'AHLs nécessaire pour induire les fonctions régulées par QS est atteint uniquement lorsque les cellules sont regroupées en amas et lorsque la boucle d'autorégulation existe. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'autorégulation positive agissant sur la production d'AHLs aurait pour fonction de coordonner plus rapidement une réponse concertée au niveau de la population, indépendamment de la distribution spatiale des cellules. Cette hypothèse implique également que le seuil d'induction serait atteint d'autant plus rapidement que les cellules seront regroupées.

Une étude récente a cherché à déterminer si la taille des agrégats formés par les cellules de *P. syringae* pv. *syringae* à la surface des feuilles avait une influence sur l'induction des phénotypes régulés par QS chez cette bactérie. En utilisant une fusion transcriptionnelle d'un gène codant une protéine fluorescente avec le promoteur du gène *ahII* (homologue de *luxI*) dont l'expression est activée en présence d'AHLs, il a été mis en évidence que l'induction d'*ahII* dépendait de la taille de l'agrégat, et qu'un amas de seulement 10 cellules pouvait provoquer une induction du QS à la surface des feuilles (Dulla & Lindow, 2008). Ces résultats illustrent le modèle développé par Hense (2007) et montrent que lorsque la population a une distribution spatiale hétérogène dans son milieu naturel, l'accumulation des AHLs peut avoir lieu localement au sein d'un groupe limité de cellules.

2.2.2. Influence de la communauté

2.2.2.1. Inactivation des AHLs par dégradation enzymatique

Dans l'environnement, les microorganismes forment des communautés dans lesquelles les bactéries productrices d'AHLs interagissent avec d'autres organismes capables de dégrader ces molécules signal. Les phénomènes d'interférence dans la communication cellulaire qui entraînent une inactivation des AHLs sont regroupés sous le terme de quorum-quenching. Les enzymes dégradant les AHLs, classées en différentes familles en fonction de leur mode d'action, ont été identifiées chez un nombre important d'espèces bactériennes, notamment présentes dans le sol (Reimann *et al.*, 2002; Zhang, 2003). Actuellement, deux familles d'enzymes inactivant les AHLs ont été identifiées : les AHLs-lactonases appartenant à la famille des protéines homologues à AiiA (Dong *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002), les acylases/amidohydrolases homologues à AiiD (Leadbetter & Greenberg, 2000; Lin *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005) (**Figure 1.8, page 14**).

Parmi les enzymes dégradatrices d'AHLs, les lactonases sont les plus étudiées et les gènes homologues à *aiiA* ont été initialement identifiés chez plusieurs espèces de *Bacillus*, notamment *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Des lactonases ont été mises en évidence chez d'autres souches à Gram positif isolées du sol, telle qu'*Arthrobacter* sp. IBN110 qui possède une lactonase codée par le gène *ahID*, et *Rhodococcus erythropolis* W2 qui possède une protéine nommée QsdA qui n'est pas homologue à AiiA mais qui semble avoir une activité lactonase (Park *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2008). Les lactonases de la famille AiiA ont également été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries à Gram négatif telles que *Klebsiella pneumoniae* qui possède une lactonase codée par *ahlK*, homologue à *ahID*, et *Agrobacterium tumefaciens* qui possède deux lactonases codées par *attM* et *aiiB*. Des analyses bioinformatiques ont mis en évidence des gènes

homologues à *aiiA* chez d'autres rhizobiacées telles que *Bradyrhizobium japonicum* ou *Mesorhizobium loti* (Carlier *et al.*, 2003). Une étude récente utilisant une approche métagénomique a révélé un nouveau gène codant une lactonase partageant peu de similarité avec les lactonases déjà caractérisées (Riaz *et al.*, 2008).

L'inactivation des AHLs peut résulter de l'activité d'autres enzymes comme les acylases, qui ont été identifiées chez des bactéries à Gram négatif telles que *Ralstonia*, *Variovorax paradoxus*, *Pseudomonas aeruginosa* et chez une bactérie à Gram positif *Rhodococcus erythropolis* W2. *Rhodococcus erythropolis* W2 est une bactérie assez singulière car, en complément d'activités lactonase et acylase, elle produit aussi une autre enzyme de la famille des oxydoréductases, capables de modifier les AHLs sans les inactiver (réduction de la substitution de type oxo au niveau du carbone 3 de la chaîne acyle) (Uroz *et al.*, 2005). La présence de ces trois activités enzymatiques chez cette souche expliquerait qu'elle puisse croître facilement dans un milieu contenant du C₆-HSL comme seule source de carbone (Uroz *et al.*, 2005).

La diversité des espèces dégradant les AHLs semble importante dans certains environnements ; c'est le cas de la rhizosphère où de nombreuses espèces bactériennes dégradatrices d'AHLs ont pu être isolées (d'Angelo-Picard *et al.*, 2005; Jafra & Van der Wolf, 2006). Des études de diversité microbienne menées sur la rhizosphère du tabac ont montré que des bactéries productrices et dégradatrices d'AHLs pouvaient coexister au sein d'un même environnement (d'Angelo-Picard *et al.*, 2005). Ces différents travaux suggèrent que l'accumulation des molécules signal au sein des populations productrices d'AHLs est fortement influencée par la présence de communautés dégradatrices et productrices d'AHLs au sein d'un même biotope. Les enzymes dégradant les AHLs pourraient conférer aux bactéries qui les produisent plusieurs avantages telles que, l'utilisation des AHLs comme source de nutriment, l'inhibition des fonctions régulées par QS chez d'autres bactéries, la résistance à l'activité antibiotique de certaines AHLs, et leur permettraient ainsi d'être plus compétitives vis à vis des autres populations (Kaufmann *et al.*, 2005; Leadbetter & Greenberg, 2000; Yang *et al.*, 2006).

2.2.2.2. Communication croisée entre espèces bactériennes

Dans leur milieu naturel, différentes espèces bactériennes produisant des AHLs de même structure ou de structure proche peuvent coexister au sein d'un même biotope. Ainsi, des bactéries pathogènes de l'homme telles que *P. aeruginosa*, *Serratia liquefaciens* ou *A. hydrophila* produisent des AHLs de type C₄-HSL impliquées dans l'induction de la synthèse de certains facteurs de virulence (Eberl *et al.*, 1996; Swift *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1995). Il

est donc fort probable que les AHLs produites par une bactérie soient perçues et reconnues par d'autres bactéries, et ainsi provoquer un phénomène de communication croisée entre des bactéries d'espèces différentes et les résultats de différentes études montrent que cette communication croisée peut survenir *in vitro* mais également *in vivo*.

Des AHLs à longues chaînes acyles, produites par *Mesorhizobium* sp., sont ainsi capables de restaurer la production de protéase et de pyoverdine chez une souche de *P. aeruginosa* dont la production d'AHLs est abolie, ce qui suggère que ces composés peuvent aussi jouer un rôle dans la communication inter-espèce (Krick *et al.*, 2007).

Le surnageant de culture de *P. aeruginosa* peut activer la production de facteurs de virulence chez *B. cepacia*, bactérie productrice d'AHLs avec qui elle cohabite dans les poumons humains (McKenney *et al.*, 1995). De plus, en condition de biofilm mixte formé *in vitro* et *in vivo* sur de modèles murins, les AHLs de *P. aeruginosa* sont capables d'activer l'expression de plusieurs gènes dont le gène *cepI* (homologue de *luxI*) chez *B. cepacia* (Riedel *et al.*, 2001). En revanche, cette communication croisée semble être unidirectionnelle.

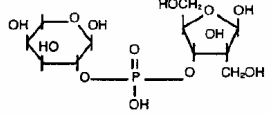
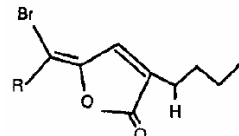
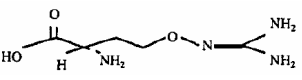
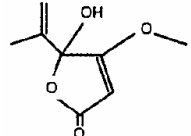
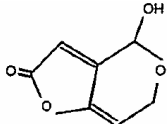

Une communication inter-espèce via les AHLs peut également survenir entre les bactéries occupant la rhizosphère du blé ou de la tomate, et conduit à l'induction de gènes régulés par QS chez des espèces non apparentées (Pierson *et al.*, 1998; Steidle *et al.*, 2001).

Il est également à noter que le phénomène de communication croisée est mis à profit pour la détection biologique des AHLs. Ainsi, l'accumulation de C₆-HSL chez *Chromobacterium violaceum* provoque la synthèse d'un pigment violet, la violacéine ; en utilisant une souche pour laquelle le gène codant l'AHL synthase est inactivé, la production de violacéine peut être restaurée par la présence d'AHLs exogènes à chaînes acyles courtes (4 à 8 carbones) (McClellan *et al.*, 1997).

2.2.2.3. Séquestration du signal

Certaines bactéries ne produisent aucune AHL mais peuvent les percevoir et induire l'expression de fonctions spécifiques en leur présence. Par exemple, *Escherichia coli* ne produit pas de molécule signal de type AHL alors qu'elle possède un régulateur de transcription homologue à LuxR, nommé SdiA, qui peut interagir avec des AHLs exogènes (Yao *et al.*, 2006). SdiA fait partie de la famille des régulateurs de type LuxR qui sont dits « orphelins », ce qui indique que la bactérie ne possède pas d'AHL-synthases endogènes ou que le régulateur en question n'interagit avec aucune des AHLs synthétisées par la bactérie (*e.g.* QscR chez *P. aeruginosa*). Le complexe SdiA/AHL régule un certain nombre de gènes cibles, notamment des gènes impliqués dans la tolérance à l'acidité (Van Houdt *et al.*, 2006). *E. coli* peut ainsi économiser le coût énergétique lié à la production d'AHLs ; cependant la

Tableau 1.2 : Production par des organismes eucaryotes de composés interférant avec le QS.
(Adapté de González et Keshavan, 2006)

Nature du composé	Structure	Organisme (type de cellule)	Exemple de système QS affecté	Référence
Agrocinopine B		Plante (Cellules végétales situées dans la galle du collet)	Système Tra chez <i>A. tumefaciens</i>	Oger et Farrand, 2001
Furanones halogénées (R = H ou Br)		<i>Delisae pulchra</i>	Système Swr chez <i>S. liquefaciens</i>	Givskov <i>et al.</i> , 1996
L-Canavanine		<i>Medicago sativa</i>	Système Sin/ExpR chez <i>S. meliloti</i>	Teplitski <i>et al.</i> , 2000 ; Keschavan <i>et al.</i> , 2005
Acide penicillique		<i>Penicillium</i> spp.	Système Las et Rhl chez <i>P. aeruginosa</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 2005b
Patuline		<i>Penicillium</i> spp.	Système Las et Rhl chez <i>P. aeruginosa</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 2005b
Interféron- γ *		Mammifères (Cellules du système immunitaire)	Système Rhl chez <i>P. aeruginosa</i>	Wu <i>et al.</i> , 2005

* L'interféron- γ est un polypeptide dont la structure est représentée sous sa forme tridimensionnelle

régulation par le complexe SdiA/AHL interviendrait uniquement lorsque *E. coli* est en présence d'autres bactéries productrices d'AHLs. En conséquence, *E. coli* pourrait séquestrer les AHLs produites par les bactéries avec lesquelles elle cohabite et ainsi interférer avec les processus d'accumulation d'AHLs produites par d'autres populations bactériennes de son environnement.

2.2.2.4. Barrière de diffusion du signal

Des bactéries ne produisant pas et n'interagissant pas avec les AHLs peuvent également se trouver au voisinage de bactéries productrices d'AHLs. Afin de déterminer si l'expression des gènes régulés par QS pouvait être affectée par la présence de bactéries ne produisant pas et ne dégradant pas les AHLs, un système de colonie artificielle constituée de trois souches bactériennes différentes a été utilisé : une souche bactérienne capable de détecter la présence d'AHLs, une souche ne produisant pas d'AHLs, et une souche produisant des AHLs (Mason *et al.*, 2005). Le niveau de détection des AHLs était plus important lorsque la souche ne produisant pas d'AHLs était présente dans la microcolonie. Cette dernière a pu constituer une barrière physique, limitant la diffusion, et favorisant l'accumulation à l'intérieur de la microcolonie, des AHLs produites par la souche avec laquelle elle cohabite. Ce résultat pourrait refléter le type d'interaction se produisant dans les environnements naturels entre des espèces productrices et non productrices d'AHLs.

2.2.3. Influence des eucaryotes sur la communication bactérienne

2.2.3.1. Inactivation des AHLs par dégradation enzymatique

Chez les animaux, les enzymes de la famille des paraoxonases, qui n'ont pas d'homologues connus chez les bactéries, peuvent dégrader les AHLs de la même manière que les lactonases bactériennes (Ozer *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'inactivation des AHLs pourrait constituer un mécanisme de défense vis à vis des infections bactériennes régulées par QS (Stoltz *et al.*, 2007; Teiber *et al.*, 2008). De plus, certaines plantes auraient la capacité de dégrader les AHLs mais les mécanismes impliqués restent à identifier (Delalande *et al.*, 2005; Gotz *et al.*, 2007).

2.2.3.2. Composés produits par des algues

Différentes études montrent que les cellules de mammifères, les plantes, les champignons ou encore les algues sécrètent des composés pouvant interférer avec la communication bactérienne basée sur les AHLs (**Tableau 1.2**). Les furanones halogénées sont des composés naturellement produits par l'algue rouge *Delisea pulchra* et qui ont une

structure analogue à celle des AHLs. Ces composés sont capables d'interférer dans la régulation des phénotypes par le QS ; en effet, ils provoquent l'inhibition de la mobilité par swarming chez *S. liquefaciens*, une diminution de la virulence et de la bioluminescence chez *V. harveyi*, et une altération de l'architecture des biofilms chez *P. aeruginosa* (Givskov *et al.*, 1996; Hentzer *et al.*, 2002; Manefield *et al.*, 2000). Cette interférence résulte du fait que ces furanones halogénées peuvent interagir avec les homologues de LuxR et favoriser la protéolyse de ces récepteurs dans la cellule (Manefield *et al.*, 2002). La production de ce type de métabolite secondaire permettrait à l'algue *Delisea pulchra* d'éviter de se faire coloniser par des bactéries (Kjelleberg & de Nys, 1997).

Chlamydomonas reinhardtii est une algue unicellulaire qui sécrète également des substances interférant avec le QS (Teplitski *et al.*, 2004). Plus d'une douzaine de composés dont la structure n'est pas connue sont capables d'activer l'activité transcriptionnelle de certains régulateurs de type LuxR tels que LasR ou CepR mais pas celle de LuxR, AhyR ou CviR, suggérant que ces composés ont une activité analogue à celles des AHLs et affectent différemment les processus de signalisation cellulaire basés sur des systèmes de type LuxR/LuxI en fonction de la bactérie considérée.

2.2.3.3. Composés produits par des plantes

D'autres études montrent que certaines plantes produisent également des composés pouvant interférer avec la communication bactérienne basée sur des AHLs. Notamment des légumineuses comme le pois, la vesce, le soja ou *Medicago truncatula*, exsudent des composés mimant les AHLs capables d'interférer avec les systèmes bactériens « biosenseurs » utilisés pour la détection des AHLs (Teplitski *et al.*, 2000). Une large étude visant à identifier des molécules inhibitrices du QS révèle, entre autre, que l'ail contient de tels composés (Rasmussen *et al.*, 2005a). Chez *S. meliloti*, la production d'exopolysaccharides, qui est régulée par QS, est inhibée par un composé analogue de l'arginine, la *L*-canavanine, produit exclusivement et en grande quantité par des graines de légumineuses telle que *Medicago sativa* (Keshavan *et al.*, 2005). Bien que la plupart des composés actifs n'aient pas été identifiés au cours des précédentes études, la découverte de tels composés suggère que les interactions qui s'établissent entre les plantes supérieures et les bactéries pathogènes, symbiotiques ou saprophytiques peuvent être « manipulées » par les plantes.

A. tumefaciens peut induire des tumeurs au niveau du collet de ces hôtes en transférant une partie de son plasmide oncogène Ti (pTi) dans le noyau des cellules végétales. L'ADN transféré code pour des gènes permettant la synthèse de phytohormones, ce qui induit la

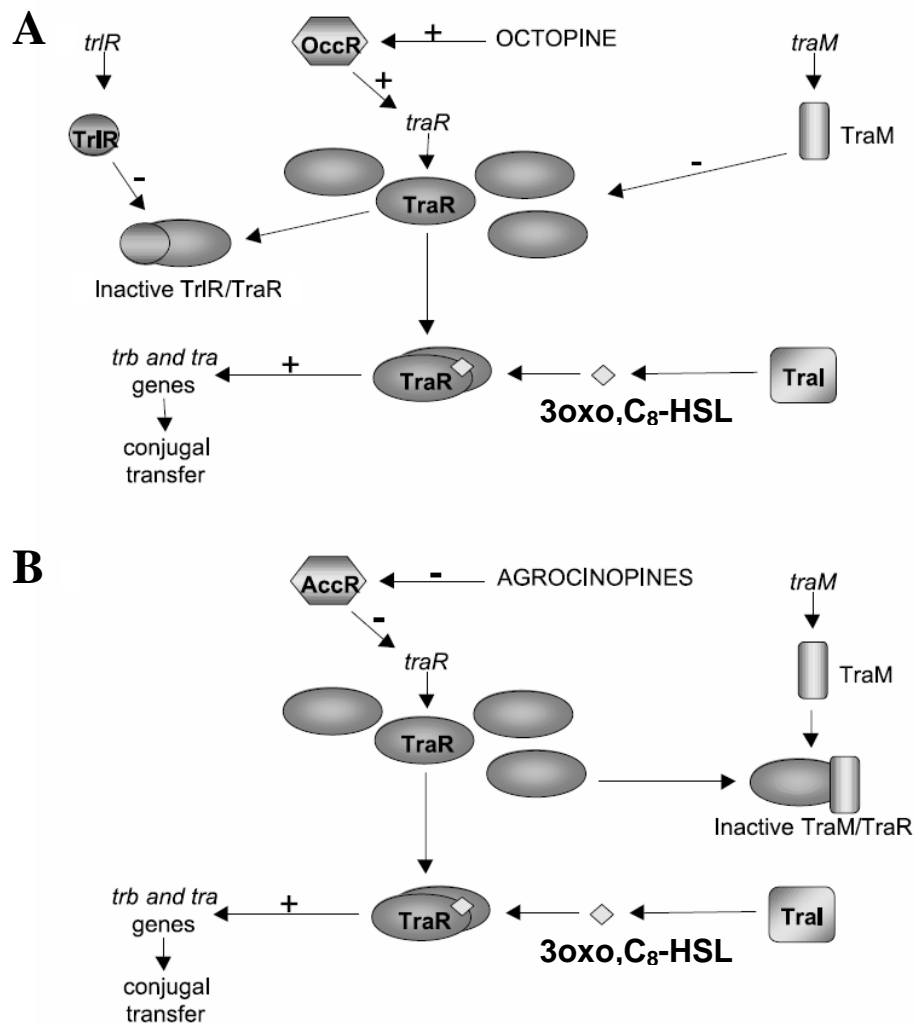


Figure 1.13 : Effets des opines produites par la plante sur la régulation du QS chez *Agrobacterium tumefaciens*.

Chez les souches d'*A. tumefaciens* reconnaissant les opines de type octopine (A), le régulateur de transcription OccR induit l'expression de TraR en présence d'octopines. A densité cellulaire élevée, le complexe TraR/3oxo,C₈-HSL peut activer l'expression des gènes *tra* et *trb* qui sont impliqués dans le transfert conjugal du plasmide Ti. TraR peut être séquestrée par la formation d'hétérodimère avec la protéine TrlR. TraM peut également inhiber l'activité de TraR, mais l'existence d'une interaction entre TraR et TraM n'a pas été mise en évidence dans ce système. Chez les souches d'*A. tumefaciens* reconnaissant les opines de type agrocinopine (B), la répression du régulateur de transcription AccR est levée par la présence agrocinopines. A densité cellulaire élevée, le complexe TraR/3oxo,C₈-HSL peut activer l'expression des gènes *tra* et *trb* qui sont impliqués dans le transfert conjugal du plasmide Ti. Le niveau basal de TraR est séquestré par la formation d'hétérodimère avec TraM. (-), inhibition ; (+) activation.

(D'après Whitehead *et al.*, 2001)

prolifération anarchique des cellules hôtes aboutissant à la formation de tumeurs. L'ADN transféré dirige également la biosynthèse et la sécrétion d'opines, sources de carbone et d'azote spécifiquement métabolisées par *A. tumefaciens*. Il existe une assez grande diversité d'opines qui sont regroupées dans au moins huit grandes familles. Un isolat d'*A. tumefaciens* possède sur son pTi des gènes codant des enzymes adaptées pour le catabolisme de certains types d'opines. Le transfert conjugatif du plasmide Ti, qui est régulé via les gènes *traI* et *traR*, est également influencé par le type d'opine catabolisée. L'expression des opérons *tra* et *trb* nécessaires à cette conjugaison requiert la présence de deux signaux : un signal émanant de la plante, une opine, indique à la bactérie que le lieu, riche en nutriments, est propice à la conjugaison ; un signal émis par la bactérie donneuse, une AHL, permet de déclencher la conjugaison à forte densité cellulaire (**Figure 1.13**) (Fuqua *et al.*, 1994; Piper & Farrand, 2000; Zhang *et al.*, 1993). Il a également été montré que l'acide salicylique et le GABA produit par la plante favorisaient l'expression d'enzymes dégradant les AHLs (Chevrot, 2006; Yuan *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que certains métabolites produits par la plante interfèrent à différents niveaux dans la régulation du QS chez *A. tumefaciens*.

2.2.3.4. Composés produits par des champignons

Plusieurs composés extraits à partir de 50 souches appartenant au genre *Penicillium* possèdent une activité inhibitrice du QS (Rasmussen *et al.*, 2005b). L'acide pénicillique et la patuline font partie des composés qui ont pu être identifiés. Des travaux réalisés par une approche transcriptomique en utilisant des puces à ADN, ont mis en évidence que ces deux molécules inhibaient l'expression de certains gènes régulés par QS chez *P. aeruginosa*. La patuline, en particulier, accélérerait le turnover des protéines de type LuxR, comme ce qui a pu être observé précédemment avec les furanones halogénées (Rasmussen *et al.*, 2005b).

2.2.3.5. Molécules produites par des mammifères et autres eucaryotes

Les dikétopipérazines (DKPs) sont des composés appartenant à la famille des dipeptides cycliques qui ont été identifiés dans le surnageant de nombreuses cultures d'espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, et *Enterobacter agglomerans* (Degrassi *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 1999). Ces composés sont capables d'interférer avec les systèmes bactériens « biosenseurs » d'AHLs et certaines DKPs pourraient entrer en compétition avec les AHLs au niveau de leur site de fixation aux régulateurs de type LuxR, et ainsi agir comme activateur ou inhibiteur du QS en fonction de l'espèce bactérienne considérée. Le rôle physiologique de ces composés n'a pas été déterminé

Tableau 1.3 : Exemples de bactéries interagissant avec les plantes et utilisant un système de régulation de type QS.

Pathogènes	Organismes	Homologues LuxI/LuxR	AHLs	Gènes et fonctions cibles	Références
<i>Pantoea stewartii</i>		Esal-EsaR	3oxo, C ₆ -HSL 3oxo, C ₈ -HSL	Expression d'EPS et T3SS, formation de biofilm	von Bodman <i>et al.</i> , 1998 ; Koutsoudis <i>et al.</i> , 2006
<i>Erwinia caratovora</i>		Carl-CarR	3oxo, C ₆ -HSL	Synthèse d'enzymes extracellulaires et T3SS	Bainton <i>et al.</i> , 1992 ;
<i>Pseudomonas syringae</i>		ExpI-ExpR AhlI-AhIR	3oxo, C ₆ -HSL	Synthèse d'antibiotique Expression d'EPS, mobilité Résistance au stress oxydatif	McGowan <i>et al.</i> , 1995 Quiñones <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		LasI-LasR RhlI-RhIR	3oxo, C ₁₂ -HSL C ₄ -HSL	Synthèse d'enzymes extracellulaires Formation de biofilm	Walker <i>et al.</i> , 2004
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		TraI-TraR	3oxo, C ₈ -HSL	Conjugaison du plasmide Ti	Zhang <i>et al.</i> , 1993 ; Fuqua <i>et al.</i> , 1994 ; Piper <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia cepacia</i> complexe		CepI-CepR Bvii-BviR	C ₈ -HSL	Production de protéases et de sidérophores Formation de biofilm	Wopperer <i>et al.</i> , 2006
Bénéfiques					
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		SinI-SinR	C ₆ -HSL, 3oxo, C ₆ -HSL C ₈ -HSL, C ₁₂ -HSL	Synthèse d'EPS II, mobilité Régulation du nombre de nodosités	Marketon <i>et al.</i> , 2002 ; Pellock <i>et al.</i> , 2002 ; Marketon <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>		CinI-CinR TraI-TraR	C ₁₄ -HSL, 3oxo, C _{1,4} -HSL C ₁₆ -HSL, 3oxo, C ₁₆ -HSL 3OH, C _{14,1} -HSL	Transfert de plasmide symbiotique Inhibition de la croissance Efficacité de la symbiose	Wilkinson <i>et al.</i> , 2002 ; Danino <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512		CinI-CinR RaiI-RaiR	3oxo, C ₈ -HSL AHLs à longues chaînes AHLs à courtes chaînes	Mobilité Régulation du nombre de nodosités	Daniels <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizobium etli</i> CFN42		TraI-TraR	3oxo, C ₈ -HSL	Transfert de plasmide symbiotique	Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium</i> sp. <i>Souche</i> NGR234		TraI-TraR	3oxo, C ₈ -HSL	Transfert de plasmide symbiotique	He <i>et al.</i> , 2003
<i>Mesorhizobium huakii</i>		?	AHLs non identifiées	Formation de biofilm	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>Mesorhizobium loti</i>		TraI-TraR	AHLs non identifiées	Excision de l'îlot symbiotique	Ramsay <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2P24		PcoI-PcoR	C ₆ -HSL, 3oxo, C ₆ -HSL C ₈ -HSL, 3oxo, C ₈ -HSL	Formation de biofilm Mobilité	Wei <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 30-84		PhzI-PhzR CsaI-CsaR	C ₆ -HSL	Production d'antibiotique Formation de biofilm	Wood <i>et al.</i> , 1997 ; Zhang <i>et al.</i> , 2001 ; Maddula <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCLL1391		PhzI-PhzR	C ₆ -HSL	Production d'antibiotique	Chin-A-Woeng <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF		Ppul-PpuR	3oxo, C ₁₂ -HSL, 3oxo, C ₁₀ -HSL 3oxo, C ₈ -HSL, 3oxo, C ₆ -HSL	Formation de biofilm	Arevalo-Ferro <i>et al.</i> , 2005 ; Steidle <i>et al.</i> , 2002

Abréviations : HSL, homosérine lactone ; EPS, exopolysaccharides ; T3SS, système de sécrétion de type III

En gras : les phénotypes régulés par QS présents chez bactéries phyto-bénéfiques et phytopathogènes, et développés dans cette synthèse.

mais ils pourraient intervenir dans la communication croisée entre bactéries. Des DKPs ont également été mises en évidence chez des levures, lichens et champignons, et dans certains tissus de mammifères, ce qui suggèrent que les DKPs produites par ces organismes eucaryotes pourraient interférer dans la communication cellulaire chez les bactéries productrice d'AHLs (Prasad, 1995).

Les études menées sur le QS chez le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* ont mis en évidence que cette bactérie était capable de percevoir l'état d'activation du système immunitaire de son hôte. En effet, les interférons gamma (IFN- γ), qui sont des protéines de signalisation synthétisées lors de la réponse immunitaire de l'hôte, peuvent activer la production de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* via le système *rhlI/rhlR* (Wagner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). Les IFN- γ sont reconnues par une protéine majoritaire de la membrane externe, nommée OprF, qui par un mécanisme encore inconnu, entraîne la surexpression de *rhlR*. L'expression de *rhlI*, favorisée par la boucle d'autorégulation activée par RhlR/C₄-HSL, permettrait la synthèse de facteurs de virulence bactériens, notamment des lectines et la pyocyanine. A l'inverse, les AHLs de type 3oxo,C₁₂-HSL stimulent la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (Smith & Iglewski, 2003). Ce dialogue moléculaire illustre le rôle central du QS basé sur les AHLs dans la mise en place de l'interaction entre une bactérie et un hôte eucaryote.

3. Rôle de la communication cellulaire via les AHLs chez les bactéries associées aux plantes : analogies et impact écologique

Des associations diverses s'établissent entre les plantes et les bactéries, qui peuvent être localisées à la surface des feuilles (phyllosphère) ou dans le sol à la périphérie des racines (rhizosphère). Ces interactions peuvent être bénéfiques, nuisibles ou neutres. Les bactéries peuvent adopter des mécanismes moléculaires similaires pour coloniser, envahir et établir éventuellement une symbiose ou une infection chez la plante hôte ; ainsi les systèmes à deux composants, les systèmes de sécrétion (Type III et Type IV) ou encore le quorum-sensing (QS) sont employés pour coordonner l'expression des facteurs essentiels pour la colonisation ou l'infection de l'hôte. Les AHLs régulent divers processus physiologiques incluant la synthèse d'exoenzymes, la production d'antibiotiques, le transfert conjugatif de plasmides, *etc...* Les parties 1 et 2 ont montré que les réseaux de régulation impliquant le QS étaient souvent complexes, spécifiques d'une souche ou d'une espèce, et que la quantité de signal émis dépendait très étroitement de l'environnement de la bactérie. Cependant, les espèces

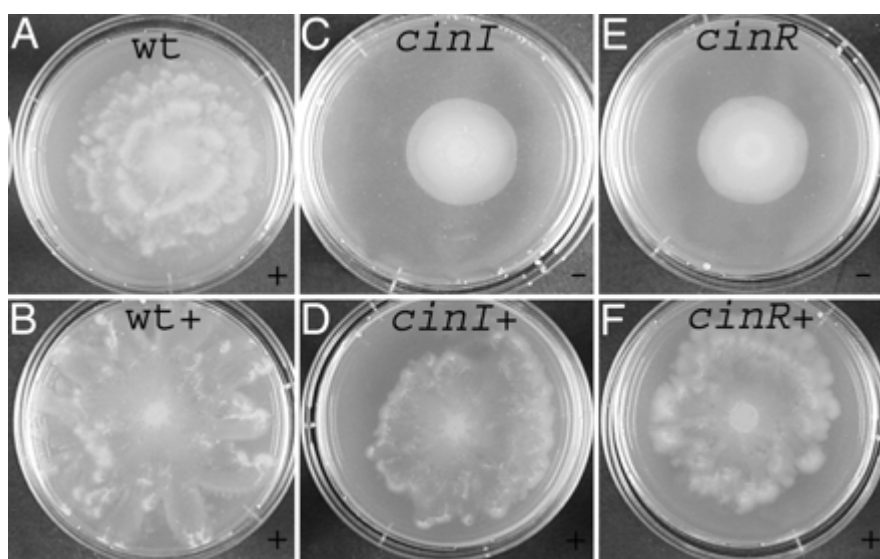


Figure 1.14 : Régulation par QS de la mobilité par essaimage chez *Rhizobium etli*.

(A, B) souche sauvage ; (C, D) mutant *cinI* (E, F) ; mutant *cinR*. La présence du plasmide portant le gène *cinI* (B, D, F) restaure la mobilité chez les mutants.

(Adapté de Daniels *et al.*, 2006)

bactériennes qui interagissent avec un même hôte, comme la plante, peuvent être confrontées à des facteurs écologiques similaires. Cette partie se propose d'étudier les analogies entre les phénotypes régulés par QS chez les bactéries phytobénéfiques et chez les bactéries phytopathogènes (**Tableau 1.3**).

3.1. Rôle du QS dans la colonisation de la plante

3.1.1. La mobilité

La mobilité est un processus clé pour la colonisation de l'environnement ou de l'hôte eucaryote. Plusieurs types de mobilité sont rencontrés dans le règne des Procaryotes. La nage (« swimming ») et l'essaimage (« swarming ») sont rendus possibles par la présence de flagelles sur la membrane externe de la bactérie. La mobilité par essaimage permet à des cellules de se déplacer en groupe, colonisant ainsi de manière coordonnée et rapide des surfaces entières. Une forme de translocation sur surfaces humides, le « twitching », est due à l'élongation et à la rétractation des pili.

La capacité à se déplacer est présente chez certaines bactéries phytobénéfiques comme *Pseudomas fluorescens* 2P24. Cette souche a été isolée de racines de blé affectées par la maladie du piétin échaudage (causée par le champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). Cette souche est notamment productrice d'un métabolite secondaire, le 2,4-diacétylphloroglucinol, composé déterminant pour la protection de la plante contre les maladies. Une souche ne produisant plus d'AHLs (mutant *pcol*, inactivé dans un homologue de *luxI*) n'est pas affectée pour la production des métabolites secondaires ; cependant son activité phytoprotectrice est atténuée. Des études complémentaires montrent que le mutant *pcol* colonise beaucoup moins efficacement les racines que la souche sauvage (réduction d'un facteur quinze). En régulant l'étape de colonisation des racines, le QS influence donc indirectement l'effet phytoprotecteur de cette souche (Wei & Zhang, 2006). Cependant, le type de mobilité impliqué dans cette colonisation racinaire reste à déterminer.

Rhizobium etli CNPAF512 est une bactérie fixatrice d'azote établissant une symbiose avec le haricot. Une mutation dans le gène *cinI* ou dans le gène *cinR* abolit la mobilité par essaimage (**Figure 1.14**). Outre son rôle dans la nodulation, le système CinI-CinR est le principal régulateur de la mobilité par essaimage chez *R. etli*. De plus, les AHLs à longues chaînes acyle produites par CinI, montrent une activité de biosurfactant favorisant ainsi directement la migration de surface de *R. etli*. (Daniels *et al.*, 2006).

Le contrôle de la mobilité par le QS est aussi rencontré chez certaines bactéries phytopathogènes. Ainsi, chez *B. glumae*, l'abolition de production d'AHLs chez une souche mutée dans le gène *tofI* entraîne la perte de mobilité par swimming et swarming et diminue

ainsi la pathogénicité de la bactérie sur le riz (Kim *et al.*, 2007). A l'inverse, chez *Pseudomonas syringae*, qui est l'agent de la maladie des tâches brunes du haricot, une mutation dans *ahII* ou dans *ahIR* accroît la mobilité par essaimage, et permet à la bactérie de coloniser les feuilles de haricot plus rapidement, augmentant ainsi sa virulence. Le régulateur AhIR intervient en réprimant la mobilité de *P. syringae* lorsque la densité cellulaire est faible (à faible concentration en AHLs). Ainsi, lorsque les ressources locales sont épuisées (c.a.d à forte concentration cellulaire), la levée de cette répression permettrait à la bactérie de se délocaliser vers un nouveau site comportant des nutriments, et donc d'assurer sa survie (Quiñones *et al.*, 2005). Preuve de la complexité des réseaux de régulation, une mutation dans le gène *expI* chez *E. chrysanthemi* pv. *zoeae*, abolit la production de 3oxo,C₆-HSL, accroît la mobilité par swimming et swarming, mais atténue la virulence du pathogène sur la plante (Hussain *et al.*, 2008). Ces différents exemples montrent que la mobilité est importante pour l'interaction avec le partenaire végétal mais que la régulation de ce processus par le QS dépend très étroitement de l'espèce bactérienne considérée.

3.1.2. Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont impliqués dans différents phénomènes de par leurs diverses propriétés (hydrophobicité, viscosité...), ils favorisent notamment l'adhésion des bactéries aux surfaces.

La production d'EPS contribue souvent à la virulence et à la survie des bactéries phytopathogènes. Chez *Pseudomonas syringae*, le système AhII-AhIR contribue à la production d'alginate qui est un composant majeur des EPS. Un double mutant *ahII-ahIR* a une production d'alginate diminuée d'un facteur trois. Le mutant montre également une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène. La production d'EPS augmente donc la fitness de la population par sa capacité à résister aux stress environnementaux et aux composés de défense de la plante, facilitant ainsi la colonisation épiphyte ou la dissémination au sein de la plante (Quiñones *et al.*, 2005).

Pantoea stewartii, bactérie phytopathogène responsable du flétrissement bactérien du maïs (flétrissement de Stewart), peut coloniser et obstruer les vaisseaux de xylème via la production massive d'un EPS, le stewartan. L'expression des gènes *cps* impliqués dans la biosynthèse du stewartan est régulée par le système EsaI-EsaR (Minogue *et al.*, 2005; von Bodman *et al.*, 1998). Un mutant *esaI* ne produit pas de stewartan et est dépourvu de virulence. En revanche, le mutant *esaR* présente un aspect hypermucoïde dû à une production accrue de stewartan ; ce régulateur agit donc comme un répresseur en réprimant l'expression des gènes *cps* à faible densité, répression qui est levée à forte concentration cellulaire via les

AHLs. Ce mutant surproducteur de stewartan a une virulence atténuée, suggérant que la biosynthèse prématurée de stewartan interfère avec le développement normal de la maladie. Un système analogue régulant positivement la synthèse d'EPS en présence d'AHLs est également présent chez *P. ananatis* (Morohoshi *et al.*, 2007). Le QS contrôlerait donc la quantité et le déclenchement de la production d'EPS chez *Pantoea*.

La production d'EPS chez certaines bactéries non phytopathogènes peut aussi être régulée via la densité cellulaire. Ainsi *Sinorhizobium meliloti*, bactérie symbiotique de la plante *Medicago sativa* (Alfalfa), produit des EPS de type II qui lui sont nécessaires pour l'invasion des nodosités. Les EPS synthétisés peuvent être de bas ou de haut poids moléculaire, cependant seuls les polymères de bas poids moléculaires sont actifs dans l'invasion de la nodosité. Une mutation des gènes *sinI* et *sinR* conduit à une diminution du nombre des nodosités (Marketon *et al.*, 2002). L'expression des gènes *exp*, impliqués dans la biosynthèse des EPS II, est régulée par le système SinI-SinR, via un second régulateur de type LuxR, ExpR (Marketon *et al.*, 2003; Pellock *et al.*, 2002). De plus, le système ExpR/Sin régule le processus de dépolymérisation des EPS de haut poids moléculaire pour permettre la synthèse d'EPS de bas poids moléculaire (Glenn *et al.*, 2007). Via le contrôle de la production d'EPS de type II par le système ExpR/Sin, le QS régule le processus de symbiose entre *S. meliloti* et Alfalfa.

3.1.3. Les biofilms

Les biofilms sont définis comme des amas de microorganismes associés à des surfaces biotiques ou abiotiques et inclus dans une matrice d'EPS. Les biofilms sont des systèmes complexes, caractérisés par une grande hétérogénéité spatiotemporelle et sont le lieu d'interactions multiples. La structuration des biofilms a pour conséquence de modifier l'état physiologique des bactéries mais aussi, d'influencer les processus de communication cellulaire. La mobilité joue un rôle primordial dans le développement des biofilms.

3.1.3.1. Les biofilms chez les bactéries phyto-bénéfiques

Un mutant *pcoI* de la souche *P. fluorescens* 2P24 présente une formation de biofilm nettement moins importante en comparaison de la souche sauvage, sur un support en PVC. Le système PcoR/PcoI pourrait donc exercer un rôle majeur sur la capacité d'attachement de *P. fluorescens* 2P24 aux racines du blé et sur leur capacité à former un biofilm racinaire (Wei & Zhang, 2006).

La capacité à former des biofilms racinaires est rencontrée chez *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) 30-84, qui inhibe le développement du champignon

Gaeumannomyces graminis var. *tritici*. Cette activité antagoniste est due à la production de métabolites secondaires, les phénazines dont la synthèse est régulée par QS, via le système PhzR/PhzI (Wood *et al.*, 1997). Un second système, CsaR/CsaI, est impliqué dans la biosynthèse de composants de surface (Zhang & Pierson, 2001). Des mutations dans les gènes de ces deux systèmes réduisent la capacité de la souche à former des biofilms sur une surface abiotique et également à la surface des graines et des racines du blé. Un mutant *phzB* (gène de structure impliqué dans la synthèse de phénazines) a une capacité à former des biofilms significativement diminuée, et l'addition de phénazines restaure la formation de biofilms (Maddula *et al.*, 2006). Le QS intervient donc sur la formation de biofilms en régulant la production des composés de type phénazines, qui s'avèrent être plus que de simples métabolites antimicrobiens. Il est également à noter qu'une inactivation des deux systèmes de QS réduit la mobilité d'essaimage de *P. chlororaphis* 30-84, phénotype qui contribue probablement à la formation de biofilms (Maddula *et al.*, 2006).

Parmi les bactéries phytobénéfiques qui forment des biofilms via une régulation de type QS, il y a également *Pseudomonas putida* IsoF, bactérie isolée de la rhizosphère de la tomate et présentant une activité antagoniste contre des phytopathogènes fongiques. Alors que la souche sauvage présente un biofilm très homogène *in vitro*, un mutant *ppuI* forme un biofilm structuré avec la présence de microcolonies et de canaux (Steidle *et al.*, 2002). Une approche protéomique a également mis en évidence le rôle du QS dans la formation de biofilm chez *P. putida* IsoF : la régulation d'environ 50 % des protéines régulées par QS identifiées dans les cultures planctoniques est inversée lorsque les cellules sont à l'état de biofilms (Arevalo-Ferro *et al.*, 2005). La régulation de la formation des biofilms par le système *ppuR/ppuI* a également été mis en évidence chez la souche *P. putida* PCL1445 (Dubern *et al.*, 2006). A densité cellulaire élevée, ce système induit la synthèse de lipopeptides cycliques agissant comme des biosurfactants, qui limiteraient l'épaississement du biofilm afin que les bactéries puissent coloniser d'autres niches lorsque les ressources nutritives s'épuisent.

Chez *Mesorhizobium huakuii*, qui établit une symbiose fixatrice d'azote avec *Astragalus sinicus* L., la production d'AHLs a été mise en évidence mais les gènes impliqués dans le QS n'ont pas été caractérisés. Afin d'étudier les fonctions régulées par QS chez cette souche, le régulateur TraR d'*Agrobacterium tumefaciens* a été exprimé afin de piéger les AHLs produites et d'empêcher l'expression des gènes cibles. Ainsi, la souche surexprimant TraR forme *in vitro* des biofilms moins épais que la souche sauvage, suggérant un rôle du QS dans la formation de biofilms (Wang *et al.*, 2004b). Les biofilms pourraient contribuer à la fitness des rhizobia dans la rhizosphère et à la colonisation des poils absorbants.

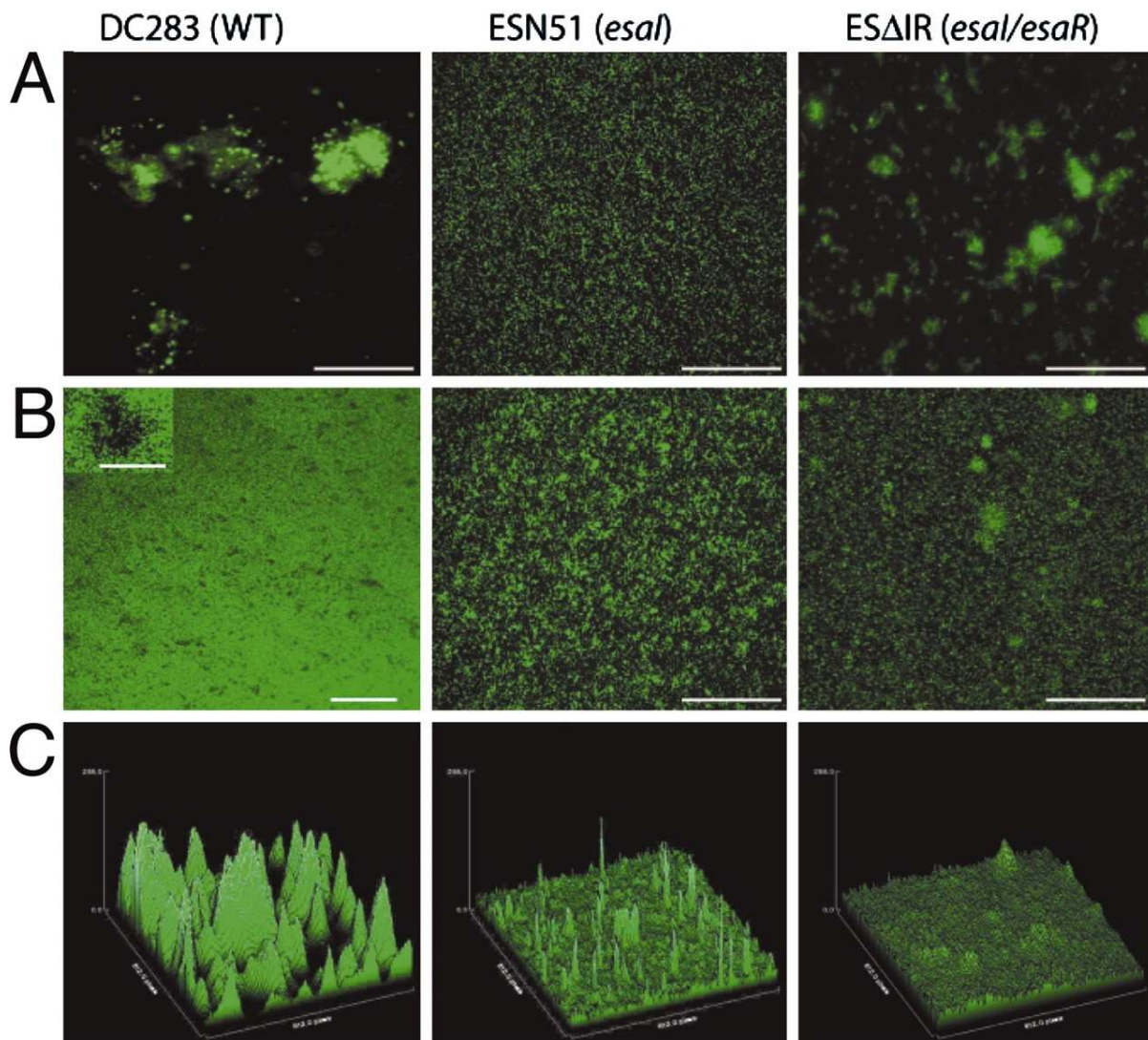


Figure 1.15 : Impact du QS sur la formation de biofilm chez *Pantoea stewartii*.

La souche *Pantoea stewartii* sauvage (WT) et des mutants inactivés dans les gènes du QS (*esaI* et *esaI-esaR*) ont été marqués constitutivement à la GFP. (A) Observation au microscope à épifluorescence des biofilms formés par les différentes souches après 12h d'incubation. (B) Images de microscope confocale à balayage des biofilms après 24h d'incubation. (C) Représentation en 3D des biofilms après 24h d'incubation.

(Adapté de Koutsoudis *et al.*, 2006)

3.1.3.2. Les biofilms chez les bactéries phytopathogènes

La capacité à former des biofilms est également retrouvée chez des bactéries pathogènes. Chez *P. stewartii*, la synthèse du stewartan est nécessaire pour une adhésion convenable et pour le développement d'un biofilm structuré (Koutsoudis *et al.*, 2006). Une souche ne produisant pas de stewartan (mutant *esaI*) est plus adhérente et forme des biofilms moins denses et moins structurés que la souche sauvage (**Figure 1.15**). Une souche surproduisant du stewartan (mutant *esaR*) a une capacité d'adhésion réduite et forme des biofilms déstructurés. Les deux types de mutants sont incapables de coloniser les vaisseaux de xylème de la plante, ce qui montre l'importance d'une régulation fine de la synthèse du stewartan et de la formation du biofilm.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquiste, pathogène opportuniste de l'homme responsable d'infections nosocomiales. La capacité de *P. aeruginosa* à produire des biofilms est un facteur qui contribue à sa persistance au sein de son hôte en lui conférant un haut degré de résistance à la réponse immunitaire du patient ainsi qu'aux traitements antimicrobiens. Les deux systèmes de QS présents chez *P. aeruginosa*, LasR/LasI et RhIR/RhII, régulent de nombreux phénotypes dont la production de facteurs de virulence et la formation de biofilms. *P. aeruginosa*, qui est naturellement présent dans le sol, peut également être un pathogène de plante ; notamment les souches PA01 et PA14 entraînent la mort des plantes au 7^{ème} jour après inoculation sur *Arabidopsis* ou sur le basilic doux. Des observations au microscope électronique ont confirmé la capacité de ces deux souches à former des biofilms à la surface des racines. De plus, l'infection du basilic doux par *P. aeruginosa* induit l'exsudation racinaire de l'acide rosmarinique, un composé présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis des cellules planctoniques de *P. aeruginosa*. Ainsi, la capacité des souches PA01 et PA14 à former des biofilms leur confère une résistance aux composés antimicrobiens sécrétés par les racines et contribue à la persistance de l'infection (Walker *et al.*, 2004).

Le complexe *Burkholderia cepacia* regroupe de nombreuses espèces ubiquistes. De nombreuses souches appartenant à ce complexe sont des pathogènes primaires ou opportunistes de l'homme. Cependant, ce complexe comprend également des souches qui peuvent être pathogènes pour certaines plantes, notamment l'oignon (il est à noter que certaines souches des espèces *ambifaria* et *vietnamiensis* présentent une activité phytobénéfique). Chez la souche de *B. cepacia* pathogène pour l'oignon (ATCC 25416 = LMG 1222) ainsi que chez les pathogènes de l'homme, le QS régule la production de facteurs de virulence et également la formation de biofilms ; en effet, la biomasse de biofilms formés

in vitro est réduite quand les souches expriment une lactonase (Wopperer *et al.*, 2006). Cependant, l'impact de la formation des biofilms *in planta* reste à étudier.

3.2. Les métabolites secondaires

Les antibiotiques font partie de la catégorie des métabolites secondaires, produits lors de la phase stationnaire de croissance. Ce sont des molécules naturelles (produites par des microorganismes), possédant une activité antibactérienne, antifongique ou antiparasitaire, et une toxicité sélective avec des mécanismes d'action spécifique.

Pseudomonas chlororaphis PCL1391 présente une activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum*, un champignon phytopathogène responsable de la putréfaction du pied et des racines de la tomate. La production de phénazine-1-carboxamide (PCN) par PCL1391 est essentielle pour l'activité phytoprotectrice exercée sur *Fusarium* spp. et apparaît maximale en fin de phase exponentielle. Une souche inactivée pour les gènes *phzI* et *phzR* (homologues respectifs de *luxI* et *luxR*) ne produit plus de PCN ; la production de PCN est restaurée chez des mutants *phzI* après addition d'AHLs, démontrant que la production de ce métabolite secondaire est régulée par QS (Chin *et al.*, 2001). La souche *P. chlororaphis* 30-84 possède deux systèmes de QS dont le système PhzI-PhzR qui régule la production de trois antibiotiques de la famille des phénazines. Les phénazines ont non seulement la capacité d'inhiber les champignons pathogènes, mais jouent également un rôle dans la persistance de la souche au sein de la niche écologique puisque ce métabolite secondaire influe sur la production de biofilm (cf. § 3.1.3.1.) (Maddula *et al.*, 2006). *Serratia plymuthica*, bactérie isolée de la rhizosphère du colza, est également capable de produire un antibiotique, la pyrrolnitrine, ayant une activité antifongique. La production de pyrrolnitrine est régulée par le système QS *splR/splI* (Liu *et al.*, 2007), montrant que la production AHL-dépendante d'antibiotiques ayant une activité antagoniste contre certains champignons phytopathogènes n'est pas restreinte au genre *Pseudomonas*.

La régulation par QS de la production d'un métabolite secondaire est également rencontrée chez une bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora*, responsable de la pourriture molle de nombreux fruits et légumes. *E. carotovora* produit un antibiotique de la classe des β -lactames, le carbapénème, et un mutant *carI* est incapable de produire du carbapénème (Bainton *et al.*, 1992; McGowan *et al.*, 1995). La synthèse des facteurs de virulence nécessaires à l'infection par *E. carotovora* est également régulée par QS (Barnard & Salmond, 2007). La production du carbapénème à haute densité cellulaire permettrait l'élimination des bactéries opportunistes qui profiteraient d'un environnement riche en nutriments généré lors de l'infection par *E. carotovora*.

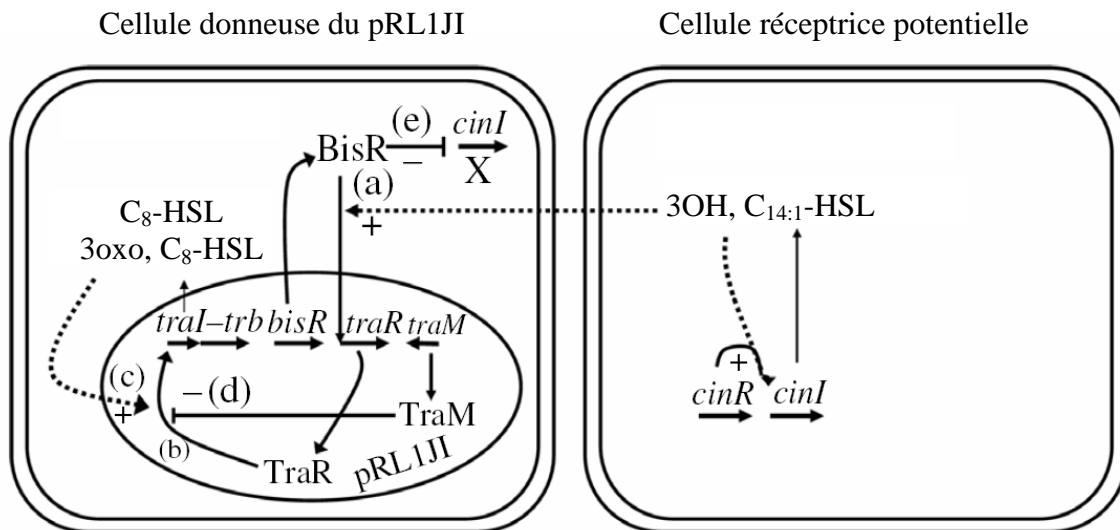


Figure 1.16 : Modèle de régulation par le QS du transfert conjugatif de pRL1JI chez *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*.

La fixation des AHLs sur les régulateurs appropriés est indiquée par des flèches en pointillées. Les effets répresseurs (-) ou inducteurs (+) des régulateurs sont représentés par des flèches pleines. (a) Chez les cellules donneuses du pRL1JI, le régulateur BisR induit l'expression de *traR* en réponse à la présence de 3OH,C_{14:1}-HSL synthétisée par l'AHL synthase CinI de la bactérie potentiellement receptrice du plasmide. (b) Le complexe TraR/3oxo,C₈-HSL et TraR/C₈-HSL induit l'expression de l'opéron *traI-trb*, produisant ainsi une boucle d'autoinduction de la production de 3oxo,C₈-HSL et de C₈-HSL par TraI (c). (d) L'expression de l'opéron *traI-trb* est inhibée lorsque *traR* est faiblement exprimé, la protéine antiactivatrice TraM pouvant séquestrer TraR (e) La production endogène de 3OH,C_{14:1}-HSL est réduite par la répression exercée par BisR sur l'expression du gène *cinR* localisé sur le chromosome. Cette répression permet à la cellule donneuse du pRL1JI d'initier un transfert conjugatif uniquement avec les cellules potentiellement réceptrices ne possédant pas le pRL1JI. (Adapté de Sanchez-Contreras *et al.*, 2007)

La production de métabolites secondaires à forte densité cellulaire par QS permettrait ainsi de persister dans la niche écologique après l'avoir colonisée.

3.3. Le transfert de plasmides

La plupart des plasmides contient des gènes qui confèrent des phénotypes potentiellement utiles à la cellule réceptrice (virulence, pathogénie, fixation symbiotique d'azote, *etc...*). Ils favorisent l'adaptation de l'hôte à des conditions locales (conditions d'environnement limitées spatialement ou temporairement).

Rhizobium sp. NGR234 peut noduler 120 espèces différentes de légumineuses. Les principales fonctions de nodulation sont codées par le plasmide pNGR234. Les gènes *traI* et *traR*, également présents sur le plasmide pNGR234, permettent de réguler l'opéron *tra* codant les fonctions de transfert du pNGR234. En régulant le transfert du plasmide pNGR234, le QS contribue au développement de l'interaction entre *Rhizobium sp.* NGR234 et ses plantes hôtes (He *et al.*, 2003).

Rhizobium etli CFN42 établit une relation symbiotique, en formant des nodosités fixatrices d'azote avec le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Cette souche possède six plasmides : p42a à p42f. Le plasmide p42a, qui est transférable à haute fréquence, est nécessaire pour la mobilisation du plasmide p42d qui code les fonctions assurant la nodulation et la fixation d'azote. Une mutation dans le gène *traI* porté par p42a abolit le transfert du plasmide p42a et par conséquent le transfert du plasmide p42d. Le transfert du plasmide symbiotique est donc également régulé par QS dans cette souche mais d'une façon indirecte (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

Chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, pouvant établir une symbiose avec le pois et la lentille, c'est le plasmide symbiotique pRL1JI qui porte les gènes requis pour la nodulation et la fixation symbiotique d'azote (**Figure 1.16**). Le transfert de pRL1JI implique une cascade complexe de régulation faisant intervenir deux AHLs synthèses (CinI et TraI) et trois régulateurs de type LuxR (CinR, TraR et BisR). Ce sont les cellules de *Rhizobium* potentiellement réceptrices du plasmide, qui en produisant une AHL à longue chaîne acyle, déclenchent la transcription de l'opéron *traI-trb* et donc le transfert du plasmide pRL1JI (Danino *et al.*, 2003; McAnulla *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2002).

Chez *Mesorhizobium loti* R7A, symbiote du lotier, les gènes impliqués dans la symbiose et la fixation d'azote sont portés par un îlot symbiotique intégré dans le chromosome bactérien. Cet îlot s'avère être un élément intégratif conjugatif, capable de s'exciser du chromosome sous une forme circulaire et d'être transféré par conjugaison à des cellules de *M. loti* non symbiotiques. Les gènes *traI* et *traR* portés par cet îlot interviennent

dans l'étape d'excision de l'îlot, suggérant que l'excision est régulée par densité cellulaire (Ramsay *et al.*, 2006).

Si le transfert des fonctions symbiotiques essentielles pour l'interaction avec la plante est régulé par QS, le même type de régulation est utilisé par une bactérie phytopathogène, *Agrobacterium tumefaciens*, pour disséminer son pouvoir pathogène (cf. § 2.2.3.3.). En effet, le système QS TraR/TraI d'*Agrobacterium tumefaciens* et les opines synthétisées par la plante, régulent le transfert conjugatif du plasmide Ti, qui contient les gènes impliqués dans la virulence de la bactérie (Fuqua & Winans, 1994; Piper & Farrand, 2000; Zhang *et al.*, 1993).

3.4. Effets des AHLs sur la plante

Si la plante a la capacité de « brouiller » le signal émis par les bactéries (cf. § 2.2.3.3.), elle semble également réceptive à ce signal. Ainsi, *Medicago truncatula* semble capable de détecter et de répondre aux AHLs émises par son symbiote *Sinorhizobium meliloti* ou par un pathogène *P. aeruginosa*, cette réponse se traduisant par une modification de l'expression de plus de 150 protéines. L'accumulation de certaines protéines apparaît liée à la concentration et à la structure de l'AHL, suggérant que les plantes peuvent distinguer les AHLs produites par différentes bactéries (Mathesius *et al.*, 2003). De plus, l'exposition de *M. truncatula* aux AHLs induit des modifications dans la sécrétion des composés mimant les AHLs (Mathesius *et al.*, 2003).

Les AHLs peuvent également entraîner une réponse systémique de la part de la plante vis-à-vis des pathogènes. Des souches colonisant les racines de la tomate et productrices d'AHLs, telles *Serratia liquefaciens* MG1 et *Pseudomonas putida* IsoF, entraînent l'augmentation de la réponse systémique de la tomate contre le champignon phytopathogène, *Alternaria alternata*. La réponse se traduit notamment par une augmentation de la synthèse d'acide salicylique, augmentation qui n'est pas observée lorsque l'expérience est réalisée avec des mutants déficients pour la production d'AHLs. Ainsi, les AHLs jouent un rôle dans le contrôle des activités biologiques au sein de la rhizosphère en induisant une réponse systémique à l'encontre des pathogènes (Schuhegger *et al.*, 2006).

Conclusion

Les premières études sur les processus de communication cellulaire chez les bactéries suggéraient un modèle de régulation relativement simple basé sur des systèmes QS permettant de réguler l'expression de gènes uniquement en fonction de la densité de population. Au fil des années, les nombreux résultats obtenus mettent en évidence que la régulation de type QS est bien plus complexe qu'initialement décrite (Fuqua *et al.*, 1994). Certaines bactéries produisent de multiples signaux et les régulateurs correspondants sont imbriqués dans une cascade de régulation comme chez *P. aeruginosa* ou *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Les gènes de type *luxR/luxI* sont souvent partie intégrante d'un réseau de régulation complexe faisant intervenir différents régulateurs de transcription, certains répondant à des signaux de l'environnement (comme GacS et RpoS chez *P. aeruginosa*). La synthèse d'AHLs est en général finement régulée au niveau de la cellule et résulte de multiples contrôles positifs mais aussi négatifs (e.g. répresseurs transcriptionnels, RsmB, lactonase). L'analyse des différents niveaux de régulation cellulaire montre que de nombreux processus régulent négativement la synthèse d'AHLs, suggérant que la bactérie « optimise » sa production de molécules signal afin d'exprimer des phénotypes régulés par QS en réponse à des paramètres environnementaux favorables.

De plus, des facteurs extérieurs interviennent sur la concentration en AHL ; outre les différents paramètres physico-chimiques affectant la stabilité des AHLs au sein de la niche écologique, différentes espèces peuvent produire des AHLs distinctes et différents genres bactériens peuvent produire les mêmes AHLs. Les processus de signalisation via les AHLs subissent donc de nombreuses interférences au sein de la communauté microbienne. De plus, certaines bactéries ainsi que des organismes eucaryotes peuvent sécréter des molécules ou des enzymes inactivant les AHLs qui perturbent les processus de communication cellulaire des populations productrices d'AHLs avec lesquelles ils coexistent au sein d'un même biotope. Les phénomènes de communication croisée entre procaryotes et eucaryotes résultent probablement du fait que la signalisation via les AHLs est un processus relativement ancien, ces molécules signal pouvant être à la fois produites par des α , β , et γ -protéobactéries. Au cours de l'évolution, les eucaryotes ont pu s'adapter à la présence de ces molécules et adopter des stratégies d'interférence dans les processus de signalisation procaryotes.

La communication cellulaire chez les bactéries utilise d'autres types de molécules signal que les AHLs (**Figure 1.2**). Les furanosyl-borate diesters (AI-2), identifiés aussi bien chez des bactéries Gram négatives que positives, seraient des molécules signal impliquées dans la communication inter-espèces. Plusieurs études menées chez *E. coli* ont montré que l'accumulation d'AI-2 était influencée par de nombreux paramètres dont la source de carbone,

l'osmolarité, le pH, le fer, et par la concentration en AI-2 elle-même (DeLisa *et al.*, 2001a; DeLisa *et al.*, 2001b; Surette & Bassler, 1999). De plus, *E. coli* et *Salmonella* pourraient importer les signaux AI-2 via des transporteurs et pourraient dégrader leurs propres AI-2 dans le cytoplasme, sans pour autant les utiliser comme source de carbone (Taga *et al.*, 2001; Xavier & Bassler, 2005b). Au sein de consortia bactériens, la production et la consommation d'AI-2 par certaines espèces créent également des interférences avec d'autres espèces communicant via des molécules de type AI-2 (Xavier & Bassler, 2005a). Ainsi les AHLs mais aussi les autres molécules signal synthétisées par les bactéries ne s'accumulent pas à un taux constant dans le milieu ; la concentration en molécule signal est donc dynamique et dépend directement des facteurs écologiques de l'environnement bactérien.

Les mécanismes de régulation du QS sont d'autant plus complexes que les réseaux de régulation du QS apparaissent relativement spécifiques d'une souche ou d'une espèce bactérienne. Au sein du genre *Pseudomonas*, la production d'AHLs a été identifiée chez plusieurs espèces (e.g. *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. syringae*), mais les AHLs synthétisées ainsi que les régulateurs QS peuvent être différents d'une espèce à l'autre. La diversité des systèmes de régulation de QS s'observe également chez d'autres genres bactériens tels que *Burkholderia*, *Erwinia*, ou *Vibrio*. Chez les bactéries associées aux plantes, les AHLs régulent de nombreux phénotypes, tels que la mobilité, la capacité d'adhésion, la formation de biofilms, la production d'antibiotiques, le transfert conjugatif de plasmides, qui selon la nature de la bactérie, auront des effets bénéfiques ou non pour la plante hôte. Le QS régule des fonctions écologiques différentes pouvant être à la fois utilisées par des bactéries pathogènes, symbiotiques ou coopératives. Présent chez des bactéries dont les stratégies écologiques diffèrent, le QS semble donc être un système de régulation global, modulant notamment l'expression de fonctions essentielles impliquées dans le passage des bactéries d'une vie libre à une vie en interaction avec un hôte.

Les conditions environnementales ayant également un impact majeur sur la communication cellulaire, l'expression des phénotypes régulés par QS n'est donc pas soumise uniquement à la présence d'un quorum de bactéries. Redfield (2002) a proposé que le terme de diffusion-sensing était plus approprié pour définir le rôle des molécules signal impliquées sans les phénomènes d'autoinduction ; la production d'autoinducteurs renseignerait plus la bactérie sur la capacité des molécules sécrétées à diffuser dans le milieu extérieur que sur la perception de la densité cellulaire (Redfield, 2002). A partir de cette proposition, d'autres termes tels que, global-sensing (Shiner *et al.*, 2005), efficiency-sensing (Hense *et al.*, 2007), compartment-sensing (Williams *et al.*, 2007), environmental-sensing (Manefield & Whiteley, 2007), ont été successivement utilisés ou proposés pour redéfinir de manière plus large le

concept de quorum-sensing sans se limiter à la seule notion de «perception de la densité cellulaire». Différentes observations appuient ces propositions et suggèrent que les AHLs auraient différents rôles : ces molécules ont un effet sur le système immunitaire des mammifères (Smith *et al.*, 2002; Telford *et al.*, 1998), provoquent des modifications du protéome chez *Medicago truncatula* (Mathesius *et al.*, 2003), pourraient aussi avoir une activité antibiotique (Kaufmann *et al.*, 2005). Ces différents résultats montrent que le QS doit être étudié dans un contexte écologique pour comprendre le(s) rôle(s) de ces molécules signal.

Cependant, devant la complexité des réseaux de régulation du QS et des nombreux facteurs modulant la réponse QS, un nombre croissant de travaux de modélisation mathématique sont proposés pour comprendre la coordination de ces différents niveaux de régulation. Des études de modélisation menées chez *Vibrio* et *Agrobacterium* permettent par exemple de déterminer à quel moment est atteinte la concentration seuil d'AHLs dans le milieu pour induire les phénotypes régulés par QS (Goryachev *et al.*, 2005; Haseltine & Arnold, 2008). De cette manière, l'évolution de la concentration en molécules signal peut également être suivie en fonction de la distribution spatiale des cellules (agrégées, planctoniques ou en biofilm) et de différents paramètres de l'environnement (Hense *et al.*, 2007; Horswill *et al.*, 2007). Il est possible de prédire l'évolution du signal et des comportements dépendant du QS dans des systèmes en modifiant simplement certains paramètres des modèles. Ne constituant pas une réelle alternative aux expériences *in vitro/in vivo*, ils peuvent cependant permettre d'orienter les études sur la compréhension du QS.

Le QS est souvent impliqué dans la virulence de nombreuses bactéries pathogènes de l'homme ou des végétaux. Partant de ce constant, de plus en plus travaux mettent en évidence que l'inhibition du QS serait un moyen de lutte efficace contre certains pathogènes de l'homme ou de la plante, et pourrait également constituer une alternative à l'utilisation des antibiotiques. Cette inhibition peut se concrétiser sous trois formes : blocage de la production de la molécule signal, inactivation de la molécule signal ou interférence avec le récepteur du signal (Cho *et al.*, 2007; Dobretsov *et al.*, 2007; Rasmussen & Givskov, 2006). Une des stratégies est de cribler un grand nombre de molécules et d'identifier certains composés capables d'inhiber le QS sans pour autant qu'ils aient un effet délétère sur l'hôte. Par conséquent, la compréhension des mécanismes de régulation du QS pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles intéressantes pour lutter contre certaines infections bactériennes.

Chapitre II :

**Caractérisation des fonctions
régulées par QS chez *A. lipoferum***

Chapitre II : Caractérisation des fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum*

Introduction

Parmi les nombreuses interactions biotiques se produisant dans la rhizosphère, les échanges de signaux entre individus ont une importance prépondérante, notamment les échanges de signaux entre bactéries. Certaines bactéries ont développé une forme de communication cellulaire basée sur la production et la perception de petites molécules diffusibles. Ce phénomène de communication bactérien appelé quorum-sensing (QS), permet à chaque bactérie, individuellement, de percevoir le moment où la population minimale ou « quorum » est atteinte, afin d'initier une réponse concertée (Fuqua & Winans, 1994). Différents types de molécules signal ont été identifiées, notamment les *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs) synthétisées par certaines bactéries à Gram négatif (cf. chapitre 1). Chez différentes bactéries phytopathogènes ou phyto bénéfiques, les fonctions nécessaires impliquées dans l'interaction avec la plante sont régulées par un mécanisme de QS utilisant des AHLs (Marketon *et al.*, 2003; Pirhonen *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 1997) (cf. chapitre 1, partie 3).

Chez la bactérie rhizosphérique *Azospirillum*, l'analyse d'une quarantaine de souches appartenant à six espèces différentes a révélé que certaines souches de l'espèce *lipoferum* isolées de la rhizosphère du riz produisaient des AHLs ; la nature chimique de ces molécules a été caractérisée (Vial *et al.*, 2006a). Pour la souche TVV3 (isolée de la rhizosphère du riz au Viêt Nam)(Trân Vân *et al.*, 1997), les gènes de type *luxI* et *luxR* (nommés respectivement *alpI* et *alpR*) ont été clonés et caractérisés. Le clonage de ces gènes dans un système hétérologue conduit à la synthèse des molécules observées confirmant que ces deux gènes sont responsables de la synthèse des AHLs. Pour les trois autres souches (souches isolées du riz au Japon et décrites comme endophytes) (Elbeltagy *et al.*, 2001), la quantité et la nature des AHLs produites sont différentes de la souche TVV3 (Vial *et al.*, 2006a); différentes techniques (amplification PCR, criblage de banques) ont été utilisées mais n'ont pas permis d'identifier les gènes de type *luxI* et *luxR* chez ces souches (Vial, 2005). En revanche, ces expériences indiquent qu'ils ne sont pas homologues aux gènes de la souche TVV3.

Comme décrit dans le chapitre 1 pour de nombreux exemples bactériens, il apparaît vraisemblable que les AHLs produites par certaines souches d'*Azospirillum* leur permettent de réguler des phénotypes en fonction de l'environnement rencontré (substrats disponibles, présence d'une plante hôte, interaction avec la plante). Dans ce contexte, un des objectifs de

cette thèse était d'identifier les fonctions régulées par QS chez *A. lipoferum* en utilisant les souches TVV3 et B518 (une des souches décrites comme endophyte) comme modèles d'étude. Afin d'étudier les fonctions régulées par QS chez ces souches d'*A. lipoferum*, la solution de choix aurait été d'obtenir un mutant ne produisant plus d'AHLs. Cette approche n'ayant pas abouti (Vial, 2005), une solution alternative basée sur la perturbation du QS a été privilégiée (Dong *et al.*, 2001). Cette approche par quorum-quenching consiste à inactiver les molécules signal de type AHL par l'action d'une enzyme, telle une AHL-lactonase qui hydrolyse le noyau lactone des AHLs. Après avoir introduit chez les souches d'*A. lipoferum* B518 et TVV3 une construction plasmidique contenant un gène codant une AHL-lactonase, l'expression de ce gène a conduit à l'inactivation complète des AHLs chez les deux souches étudiées. Deux approches ont ensuite été entreprises afin d'identifier des fonctions régulées par QS chez ces souches : une première approche, ciblée, a consisté à analyser des phénotypes particuliers potentiellement régulés par QS (notamment mobilité, production de phytohormones, production de sidérophores) ; une seconde approche, globale, a consisté à comparer le protéome des souches exprimant l'AHL-lactonase avec celui des souches sauvages afin d'identifier des protéines différenciellement exprimées. Les différents résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de rédiger un article qui a été accepté dans le journal *Research in Microbiology*.

A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*

Mickaël BOYER¹, René BALLY¹, Sandrine PERROTTO¹, Clémence CHAINTREUIL² and Florence WISNIEWSKI-DYÉ^{1*}.

¹Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France; IFR 41, Villeurbanne, F-69622, France.

²LSTM, Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Running title: Quorum-sensing in *Azospirillum*

Journal: Research in Microbiology

Mickaël BOYER: michael.boyer@univ-lyon1.fr

René BALLY: rene.bally@univ-lyon1.fr

Sandrine PERROTTO : sandrine_cottin@hotmail.com

Clémence CHAINTREUIL: clemence.chaintreuil@mpl.ird.fr

Florence WISNIEWSKI-DYÉ: wisnews@biomserv.univ-lyon1.fr *Correspondence and reprints*

Abstract

A quorum-quenching approach was exploited in order to identify functions regulated by quorum-sensing (QS) in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum lipoferum*. The AttM lactonase from *Agrobacterium tumefaciens* was shown to enzymatically inactivate *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) produced by two *A. lipoferum* strains. The targeted analysis of several phenotypes revealed that in strain B518, a rice endophyte, AHL inactivation abolished pectinase activity, increased siderophores synthesis and reduced indole acetic acid production (in stationary phase) but no effect was observed on cellulase activity and on swimming and swarming motilities. None of the tested phenotypes appeared to be under QS-regulation in strain TVV3 isolated from the rice rhizosphere. Moreover, AHL inactivation had no deleterious effect on the phytostimulatory effect of the two strains *in vitro*.

A global proteomic approach revealed little modification of the protein patterns when comparing *attM*-expressing TVV3 and the wild-type strain, but numerous proteins appeared to be regulated by the AHL-mediated QS system in strain B518. Several proteins identified by MS-MS analysis revealed to be implicated in transport (such as OmaA) and chemotaxis (ChvE).

Altogether, results indicate that in *A. lipoferum* QS regulation is strain-specific and is dedicated to regulate functions linked to rhizosphere competence and adaptation to plant roots.

Keywords: *Azospirillum*; IAA; pectinase; PGPR; quorum-sensing.

Introduction

Diverse bacteria possess the ability to regulate functions in a population-density manner. In proteobacteria, this regulation involves the synthesis of diffusible signalling compounds, usually belonging to the *N*-acyl-homoserine lactones family (AHLs) accumulating throughout growth. When a threshold concentration of bacteria (i.e. a quorum) is reached, nearby cells act together in a cooperative manner by the exchange of AHL signals that trigger specific functions (e.g. luminescence, production of extracellular enzymes, plasmid transfer, etc). The AHL-regulated functions are often crucial for plant-bacteria interactions, whether pathogenic or beneficial bacteria. For example, virulence factors of the soft-rotting causing agent, *Erwinia carotovora*, are expressed only at high population density, resulting in a successful plant infection (Newton & Fray, 2004). AHL-mediated QS was shown to govern the expression of approximately 5 to 10% of the genes in *Pseudomonas aeruginosa* or *Burkholderia cepacia*, suggesting that QS is actually involved in complex regulatory networks (Riedel *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003). 2D-PAGE approaches revealed that quorum-sensing affects over 1.7% and 5% of the protein content in the symbiotic bacteria *Rhizobium leguminosarum* and *Sinorhizobium meliloti*, respectively (Cantero *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003).

Rhizosphere-adapted bacteria can benefit the plant directly by stimulating root growth (associative symbiosis) or indirectly by controlling plant-parasitic organisms (antagonism) and the role of quorum-sensing in these cases is not extensively studied. These non-nodulating bacteria are usually referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Indirect mechanisms rely on preventing deleterious effects of pathogenic microorganisms, by the synthesis of antifungal compounds or by competing for nutrients such as iron (Haas *et al.*, 2002). Such biocontrol properties were shown to be regulated by quorum-sensing in several rhizosphere pseudomonads (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001; Pierson *et al.*, 1994) and in *Burkholderia ambifaria* (Zhou *et al.*, 2003). As for direct mechanisms such as synthesis of phytohormones and vitamins, inhibition of plant ethylene synthesis, phosphate solubilization or the stimulation of plant defense, the involvement of QS remains to be demonstrated. The occurrence of AHL production was recently demonstrated in PGPR *Burkholderia* but whether these molecules regulate phytobeneficial traits remain to be demonstrated (Poonguzhali *et al.*, 2007).

Azospirillum, a free-living diazotroph, can promote plant growth of cereals and grasses leading to an increase of crop yield by up to 30%, an effect mainly attributed to the production of phytohormones, notably indole-3-acetic acid (IAA) (Dobbelaere *et al.*, 2003). AHL production was recently reported for four strains, belonging to the *lipoferum* species and

isolated from rice, out of the forty strains tested (Vial *et al.*, 2006). AHLs molecules were structurally identified for two strains; *A. lipoferum* TVV3 produces 3oxo,C₈-HSL (*N*-3-oxo-octanoyl-homoserine-lactone), C₈-HSL (*N*-octanoyl-homoserine-lactone), 3oxo,C₁₀-HSL (*N*-3-oxo-decanoyl-homoserine-lactone), 3OH,C₁₀-HSL (*N*-3-hydroxy-decanoyl-homoserine-lactone) and C₁₀-HSL (*N*-decanoyl-homoserine-lactone) whereas *A. lipoferum* B518 produces 3oxo,C₆-HSL (*N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine-lactone), C₆-HSL (*N*-hexanoyl-homoserine-lactone), 3oxo,C₈-HSL, 3OH,C₈-HSL and C₈-HSL. As genetic determinants involved in AHL production (*luxI* and *luxR* homologs) could be identified only for *A. lipoferum* TVV3, and as mutants deficient for AHL production could not be obtained by allelic exchange, the involvement of AHL-regulated functions in *Azospirillum*-plant interactions is still questioned. The aim of the present study was to identify QS-regulated functions in *A. lipoferum*. For this purpose, the AttM lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* (i.e. an enzyme that hydrolyzes the lactone ring of AHL) was expressed in the two aforementioned strains, leading to total disruption of AHL signals. Two types of analysis were undertaken on the strains no longer accumulating AHL. First, the analysis was targeted towards putative quorum-sensing regulated functions; second, a global proteomic approach was performed.

Methods

Bacterial growth conditions and AHL extraction.

Azospirillum lipoferum TVV3 and B518 have been isolated respectively from the rice rhizosphere (rice cultivar IR64) in Viet-Nam (Van *et al.*, 1997) and from disinfected stems of rice (cultivar Kasalath) in Japan (Elbeltagy *et al.*, 2001). They were grown at 28°C in modified Luria-Bertani (LBm, containing 5 g liter⁻¹ of NaCl) or in AB minimal medium (Shaw *et al.*, 1997) containing 0.2% malate (instead of mannitol) and 1 mg l⁻¹ of biotin, hereafter referred as AB-mb. *Escherichia coli* strains were grown in LBm broth or agar at 37°C. Where appropriate, antibiotics were added at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg ml⁻¹; kanamycin, 40 µg ml⁻¹.

For analysis of spent culture supernatants, *Azospirillum* strains were grown in 50 mL AB-mb with appropriate antibiotics for 20 h to OD₅₈₀ readings of 1.5 (i.e. late exponential phase). The AHLs were then extracted, separated by thin layer chromatography (TLC) and revealed using the AHL biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL1(pZLR4) as previously described (Shaw *et al.*, 1997; Vial *et al.*, 2006).

Strain construction.

To construct pBBR1-*attM*, a fragment of 1606 bp carrying the P_{ntpII} promoter and the *attM* gene was first amplified by PCR from pMIR102 (Carlier *et al.*, 2003) with primer F2397 (5'-GAGGCAGTTCCATAGGATG-3') and F2398 (5'-GAGAGCTTTGTTGTAGGTGGA-3'). This fragment was cloned in pGEM-T easy vector (Promega, Madison, MI). The resulting plasmid pGEM-T-*attM* was digested with *SacI* and *ApaI*; the released fragment was ligated into the vector pBBR1MCS-2 (digested with *SacI* and *ApaI*) to produce pBBR1-*attM*. Empty vector and pBBR1-*attM* were introduced by transformation into *E. coli* S17.1 λ pir. These plasmids were then transferred into *A. lipoferum* by biparental mating as described previously (Pothier *et al.*, 2008).

Motility assays.

Swarming ability was tested on semisolid LBm plates containing 0.4, 0.5 or 0.75% of noble agar (Difco Laboratories, Detroit, MI). 10⁷ cells of a culture grown overnight in liquid LBm were inoculated on top of freshly prepared swarm plates. The plates were incubated for 5 days face up at 28°C, then diameters of motility halos were measured. Swimming motility was assessed by observation through a phase contrast microscope (Zeiss, Jena, Germany) and by measuring diameters of motility halos on LBm plates containing 0.2%.

Pectinase and cellulase activities.

10^7 cells of a culture grown overnight in liquid AB-mb were loaded onto AB plates containing 0.1% of malate and 0.4% of polygalacturonic acid (PGA) or 0.1% of malate and 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) to detect respectively pectinase and cellulase activity. Plates were incubated 4 days at 28°C and revealed according to (Park *et al.*, 2000).

Siderophore production.

Siderophore production was first assayed on plates by inoculating 10^7 cells from a fresh AB-mb culture onto plates of iron-limiting AB-mb (0.5 μM FeCl_3) containing the chrome azurol S (CAS) dye (Schwyn & Neilands, 1987). After a 2-day incubation at 30°C, the diameters of orange halos formed on the CAS plates were observed. A more sensitive CAS assay was also performed on supernatants of cultures grown in iron-limiting AB-mb broth. An aliquot of culture was removed at different OD readings and centrifugated; the supernatant was mixed with an equal volume of CAS solution and incubated for 3 h at 28°C. OD measurements at 630 nm were then performed using medium incubated in the same conditions as a blank. Values correspond to OD differences between the blank (highest value of OD_{630}) and the sample (the presence of siderophores decreases the OD_{630}) and are considered to be significant when above 0.1, as suggested by Arahou (Arahou *et al.*, 1998).

IAA production.

Azospirillum strains were grown in AB-mb supplemented with 2.5 mM of L-tryptophan. An aliquot of culture was removed at different OD readings (0.5, 1.0, 1.5, 2.0) and centrifugated; the supernatant was assayed for the presence of IAA and related indole compounds by a colorimetric technique, derived from that of Salkowski and described by Glickmann and Dessaux (Glickmann & Dessaux, 1995).

Plant growth promotion assay.

A simple gnotobiotic assay was developed to assess rice growth promotion by *Azospirillum*. Bacterial strains were grown overnight in 50 ml AB-mb medium. Cells were centrifugated and resuspended in a defined volume of 0.8% NaCl in order to obtain a concentration of 10^9 cells ml^{-1} . Then $5 \cdot 10^8$ cells were mixed with 50 ml distilled water agar (0.8%) and were introduced into 120x120x17 mm square plates (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany). Seeds of rice (*Oryza sativa* cultivar Kasalath, International Rice Research Institute, The Philippines) were dehusked and disinfected with the following treatments: four times for 5 min in a 3% H_2O_2 solution; 15 min in a 1% filtered calcium

hypochlorite solution; 5 min at 37°C in a 1% filtered calcium hypochlorite solution; and finally five times for 4 min in 2% sodium thiosulfate solution. After each immersion, seeds were rinsed five times with sterile distilled water (3 min per rinse). Five decontaminated seeds were then laid onto agar plates. Plates were incubated vertically during 7 days in a growth chamber under the following conditions: 75% humidity, 16 h light at 28°C and 8 h dark at 22°C. Root development and architecture were examined by image analysis (WinRHIZO; Régent Instrument Inc., Québec City, Canada) by quantifying the total root length, the root surface area, the average root diameter, the total root volume and the number of tips and forks, with at least fourteen plants per treatment.

Protein extraction.

For extraction of intracellular soluble proteins, *Azospirillum* strains were grown in 500 ml LBm to OD₅₈₀ readings of 1.3. Cells were harvested by centrifugation (6500 rpm; 4°C; 15 min), washed in 25 ml ultra pure water and finally resuspended in 10 ml ultra pure water. Lysis of bacterial cells was achieved by passing the suspension four times through a French press (French Pressure Cell Press, AMINCO American Instrument Company, Maryland) at 102 atm (1500 p.s.i.). The unlysed cells and cell debris were removed from the suspension by centrifugation (15,000 g; 4°C; 20 min). Protein concentration in the supernatant was assessed by bicinchoninic acid protein assay according to the manufacturer's protocol (Pierce, Rockford, IL). For 1D-PAGE, 200 µg of proteins were loaded per well and separated by SDS-PAGE using 12% SDS-polyacrylamide gels according to the method of Laemmli (Laemmli, 1970). For 2D-PAGE, a 2D-Clean Up Kit (Amersham Bioscience, Orsay, France) was used to remove salts and insoluble impurities and the pellets were resolubilized in 200 µl of rehydration buffer composed of 8.5 M urea, 3% CHAPS, 50 mM DTT, 0.25% nonidet P40, 0.2% IPG buffer pH 4-7 (Amersham Bioscience) and 0.001% bromophenol blue.

Outer membrane-associated and extracellular proteins were extracted according to (Riedel *et al.*, 2003) on a supernatant of 500 ml.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE).

IPG strips (11 cm, pH 4 to 7 linear, Amersham Bioscience) containing 1 mg of proteins were passively rehydrated overnight. The isoelectric focusing was performed with an IEF Protean cell (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) at 20°C under the following conditions: 50 µA per strip maximum, 10 h at 50 V with a rapid voltage ramping slope, 2 h at 100 V, 2 h at 1,000 V and 2.5 h at 8,000 V with a linear voltage ramping slope, 8,000 V until a total of 45,000 Vh was reached. IPG strips were placed at -80°C for at least 2 h. IPG strips

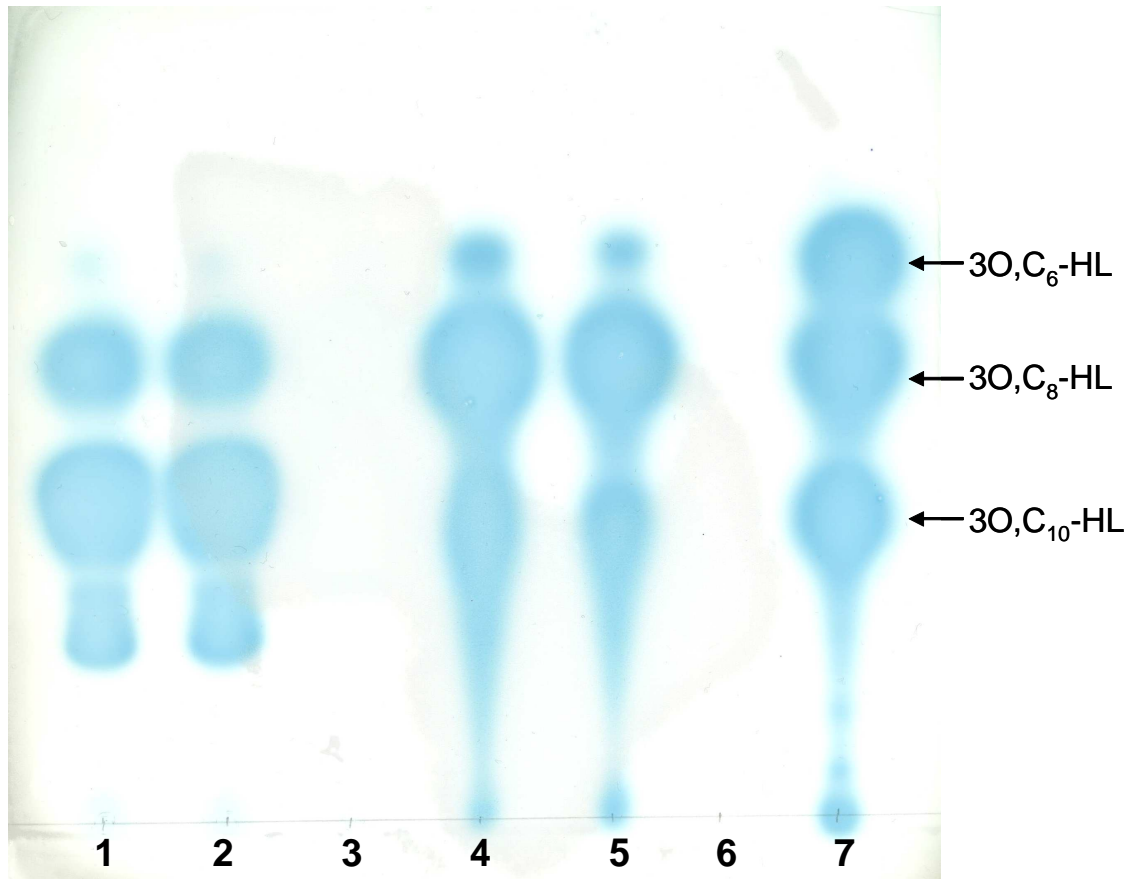


Figure 2.1: Thin layer chromatography of AHLs from wild-type, AttM-expressing and vector control *Azospirillum lipoferum* strains.

Cultures were grown in AB-mb broth for 20 h. AHLs extracted from cell-free culture supernatants were separated by TLC and detected using an overlay of agar seeded with *A. tumefaciens* NTL1(pZLR4). Lanes 1, 2 and 3: extracts from respectively *A. lipoferum* TVV3, TVV3(pBBR1), TVV3(pBBR1-*attM*) equivalent to 20 ml of culture; Lanes 4, 5 and 6: extracts from respectively *A. lipoferum* B518, B518(pBBR1), B518(pBBR1-*attM*), equivalent to 10 μ L of culture; lane 7: oxo-substituted standards 3O,C₆-HSL, 3O,C₈-HSL and 3O,C₁₀-HSL.

Table 2.1: Analysis of phenotypes affected by heterologous expression of the AttM lactonase in *A. lipoferum* strains.

Phenotypes tested	<i>A. lipoferum</i> strains					
	TVV3			B518		
	No plasmid	pBBR1	pBBR1- <i>attM</i>	No plasmid	pBBR1	pBBR1- <i>attM</i>
Motility	+	+	+	+	+	+
Pectinase activity	-	-	-	+	+	-
Cellulase activity	+	+	+	+	+	+
Siderophore production	+	+	+	+	+	++
AIA production	+	+	+	+	+	(+)

(+) A reduction of AIA production was observed at late-log and stationary phases (see Figure 2.2D).

were then equilibrated first in equilibration solution A (50 mM Tris, 6 M urea, 30% glycerol, 30% SDS 10% containing 10 mg ml⁻¹ DTT) for 15 min and then in equilibration solution B (containing 45 mg ml⁻¹ iodoacetamide instead of DTT) for 15 min. Proteins were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel during 4 hours at 30 mA and stained with a Coomassie blue G 250 (Fermentas, Burlington, Canada) or with silver staining (Rabilloud, 1999).

Gel analysis and protein identification.

Image acquisition was carried out on a GS 800 scanner (Biorad) and 2D image analysis was performed by PROTEOMWEAVER Software® (Biorad). Global profiles of the gels (three gels per culture, two independent cultures) were compared to assign clear differences in intensity. Selected proteins were subjected to NanoLC/nanospray/tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) at Institut de Biologie et Chimie des Protéines (UMR 5086, Université Lyon 1, France) according to a method previously described (Fontana *et al.*, 2007). Peptide sequences were used for homologies searches in *A. lipoferum* 4B draft genome or in non-redundant protein database of NCBI by using the online software MS-Homology (MS-Homology belongs to the Proteomics tools available on <http://prospector.ucsf.edu/>).

Results

Effects of AttM production on AHLs accumulation in *A. lipoferum*.

Among the four *A. lipoferum* AHL producers previously identified, the two strains for which AHLs molecules were structurally identified were chosen for the present study: (i) strain TVV3 isolated from the rice rhizosphere and whose *luxI* and *luxR* homologs have been identified but could not be inactivated (due to arduous implementation of genetics procedures in *A. lipoferum*); (ii) strain B518 isolated as a rice endophyte and producing larger amount of AHLs than strain TVV3. In order to quench AHL accumulation in *A. lipoferum*, the *attM* gene from *Agrobacterium tumefaciens*, encoding an AHL-lactonase, was cloned under the constitutive P_{*nptII*} promoter, and conjugated into *A. lipoferum*. The effect of AttM heterologous expression in the transconjugants was examined by TLC using *A. tumefaciens* NTL1(pZLR4) as the AHL biosensor strain (**Figure 2.1**). AHL levels in culture supernatants of strains expressing AttM were undetectable, even for B518 that produces high levels of AHLs, while AHL levels of strains carrying the vector control were identical to that of the corresponding wild-type strains. These strains no longer accumulating AHLs were subsequently used to identify quorum-sensing regulated functions.

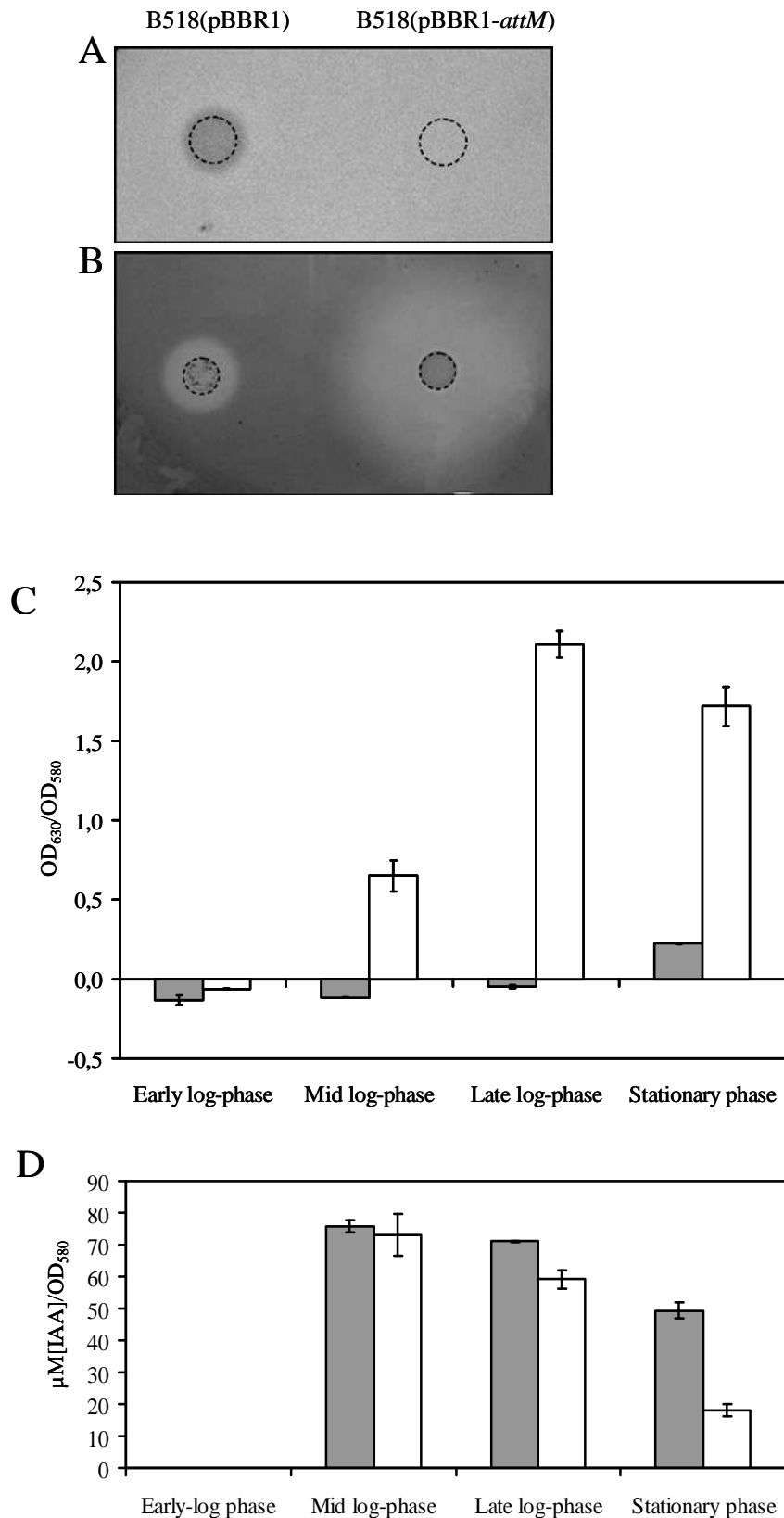


Figure 2.2: Pectinase activity, siderophore production and IAA production of AttM-expressing and vector control *Azospirillum lipoferum* strains.

A, pectinase activity assayed after 4 days of growth on AB plates containing 0.1% of malate and 0.4% of polygalacturonic acid. B, Cas plate assay after 2 days of growth on iron-limiting AB-mb media. C, Cas liquid assay performed on supernatants of bacteria cultivated iron-limiting AB-mb broth. D, supernatants were assayed for the presence of IAA and related indole compounds. In AB-mb medium, early log-phase, mid log-phase, late log-phase and stationary phase correspond respectively to OD readings of about 0.5, 1, 1.5 and 2. All experiments were performed in triplicate. For C and D, error bars represent SD. Dotted circles in A and B indicate the position of inoculated bacteria.

Phenotypes affected by AHL inactivation in *A. lipoferum*.

Several phenotypes previously shown to be QS-regulated in plant-associated bacteria were investigated (**Table 2.1**). Firstly, swimming and swarming motilities were analyzed; no differences could be observed between AttM-producing strains and the corresponding strains carrying the control vector (**Table 2.1**), indicating that QS was not involved in regulation of motility. Secondly, pectinase and cellulase activities were examined. Such activities were previously reported for strain B518 isolated as an endophyte (Elbeltagy *et al.*, 2001). As for strain TVV3, only a cellulase activity was evidenced (**Table 2.1**). When strains no longer accumulating AHLs were analyzed, only pectinase activity appeared to be impaired in B518(pBBR1-*attM*) as no degradation of polygalacturonic acid was observed (**Figure 2.2A and Table 2.1**). This result suggested that pectinase activity is positively regulated by AHL-mediated QS in B518. Thirdly, siderophore production was studied in an iron-deficient media; a CAS plate assay revealed a stronger siderophore production for B518(pBBR1-*attM*) compared to B518(pBBR1) (**Figure 2.2B**), whereas no difference could be observed between TVV3(pBBR1-*attM*) and TVV3(pBBR1). The observation made for B518 was supported by a more sensitive CAS liquid assay; not only was the siderophore production by B518(pBBR1-*attM*) greater by up to seven fold in stationary phase, but this production appeared earlier in the growth phase (**Figure 2.2C**). These data clearly indicate that QS negatively regulates siderophore production in B518. Fourthly, as the plant growth-promoting ability of *Azospirillum* is mainly attributed to the production of IAA, IAA production was investigated. A preliminary assay performed at late log-phase revealed that IAA production occurred only under tryptophane induction and reached concentrations of 71.1 ± 0.2 and 60.1 ± 5.5 μM IAA/OD₅₈₀ for wild type strains B518 and TVV3. AHL inactivation significantly affected IAA production for B518(pBBR1-*attM*) (**Table 2.1**). IAA production was then measured at different OD readings and interestingly the reduced IAA production was observed only when B518(pBBR1-*attM*) had reached the stationary phase (**Figure 2.2D**).

Effects of AHL inactivation on *A. lipoferum* plant-growth promoting ability.

The phytostimulatory effects of *A. lipoferum* AHL producers have only been evidenced for TVV3 in greenhouse experiments (unpublished results). An *in vitro* inoculation assay was developed under gnotobiotic conditions; root development of inoculated plants was better than that of control plants, and the response to bacterial inoculation was similar whatever the strain inoculated (**Table 2.2**). Inoculation had positive effects compared to the control, by increasing approximately 1.5-fold the total root length, the root surface area, the total root volume, and the number of tips and forks, but the average root diameter was not modified, a

Table 2.2: Effects of *A. lipoferum* inoculation on root system architecture of rice.
(mean \pm SE; n = 14)

Root system parameters	Control	<i>A. lipoferum</i> strains					
		TVV3			B518		
		No vector	pBBR1	pBBR1- <i>attM</i>	No vector	pBBR1	pBBR1- <i>attM</i>
Total root length (cm plant ⁻¹)	16.1 \pm 1.4	22.4 \pm 1.6	26.3 \pm 2.5*	24.3 \pm 2.0*	26.4 \pm 2.6*	28.2 \pm 2.1*	32.8 \pm 2.6*
Root surface area (cm ² plant ⁻¹)	2.41 \pm 0.19	3.41 \pm 0.21*	3.72 \pm 0.26*	3.86 \pm 0.27*	3.70 \pm 0.30*	3.88 \pm 0.21*	4.34 \pm 0.29*
Average root diameter (mm plant ⁻¹)	0.49 \pm 0.02	0.49 \pm 0.02	0.46 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02	0.46 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	0.43 \pm 0.01
Total root volume (mm ³ plant ⁻¹)	29.1 \pm 2.5	42.1 \pm 3.5*	42.4 \pm 2.6*	49.3 \pm 3.0*	41.6 \pm 2.8*	42.9 \pm 2.0*	46.3 \pm 2.7*
Number of tips (plant ⁻¹)	39.9 \pm 4.4	49.9 \pm 4.3	58.5 \pm 7.4*	48.4 \pm 5.8	64.4 \pm 5.9*	71.4 \pm 5.2*	85.4 \pm 6*
Number of forks (plant ⁻¹)	50.9 \pm 5.6	77.9 \pm 8.3*	73.1 \pm 8.3*	66.3 \pm 7.6	84.5 \pm 11.1*	84.3 \pm 6.9*	108 \pm 9.7*

* Statistical differences (Tukey, $P < 0.05$) between control and inoculated treatments are indicated by an asterisk.

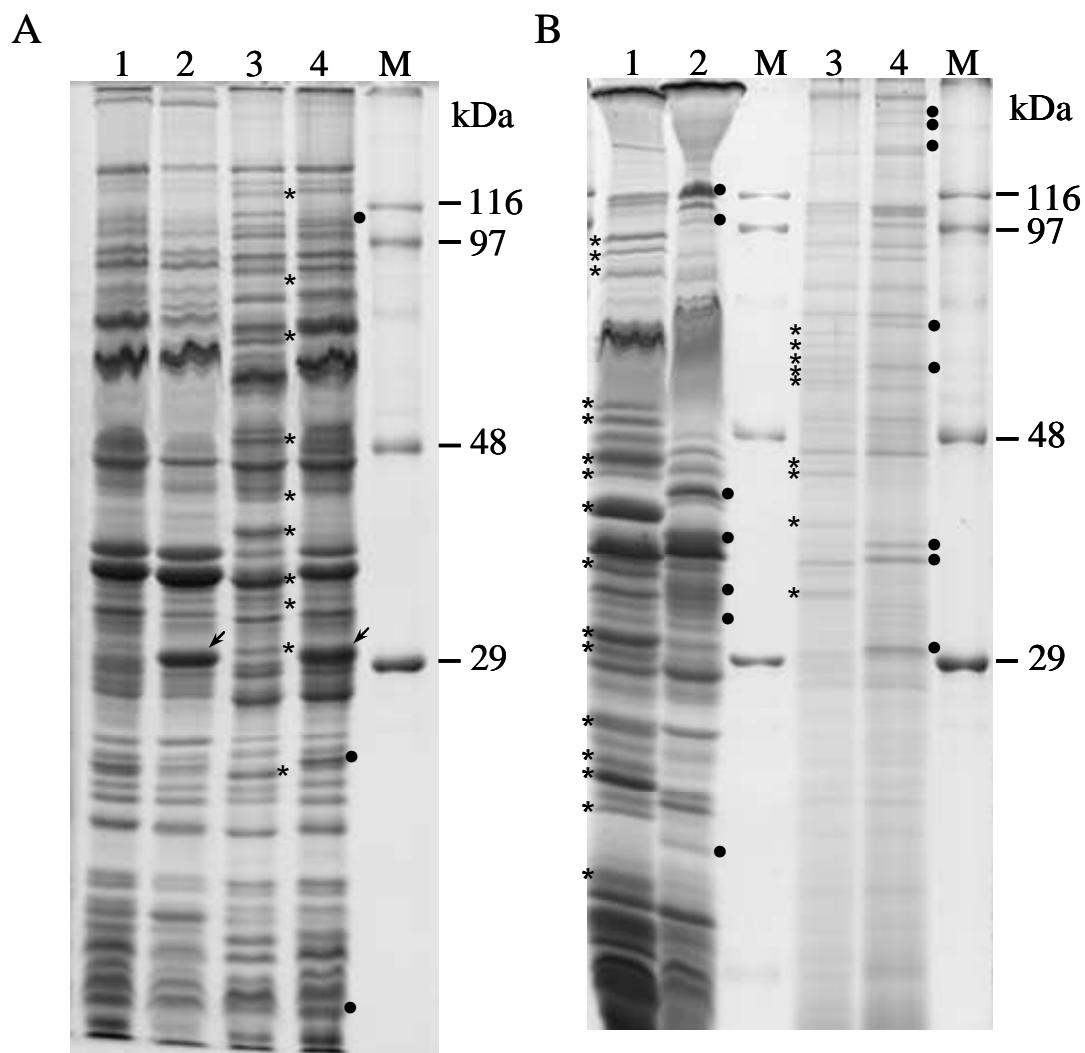


Figure 2.3: SDS-PAGE of proteins extracted from AttM-expressing and vector control *Azospirillum lipoferum* strains.

A, intracellular soluble proteins; lane 1, TVV3(pBBR1); lane 2, TVV3(pBBR1-*attM*); lane 3, B518(pBBR1); lane 4, B518(pBBR1-*attM*); lane M, Molecular mass markers. The black arrows indicate the AttM protein. B, outer membrane-associated proteins (lanes 1 and 2) and extracellular proteins (lanes 3 and 4); lanes 1 and 3, extracts from B518(pBBR1); lanes 2 and 4, extracts from B518(pBBR1-*attM*); lanes M, Molecular mass markers. Comparison of protein profiles reveals proteins that are only present in B518(pBBR1) (indicated by asterisks) and proteins that are only present in B518(pBBR1-*attM*) (indicated by dots).

result already obtained in field experiments with another *A. lipoferum* strain (El Zemrany *et al.*, 2006). Noticeably, the effect of the inoculant was statistically more significant with B518 than with TVV3, a result that might be attributable to the rice cultivar used (Kasalath), which is not the original rice cultivar of strain TVV3. Phytostimulatory effects of strains expressing the AHL-lactonase were clearly not affected by AHL inactivation (**Table 2.2**). pBBR derivatives were stably maintained in the strain without selection throughout the experiment (data not shown).

Effects of AHL inactivation on *A. lipoferum* proteome.

In order to gain further insight into the QS-regulated functions in *A. lipoferum*, a global proteomic approach was also undertaken. Soluble intracellular proteins were first analysed; next to the appearance of the AttM band (29.3 kDa), minor modifications of the protein patterns were detected when comparing TVV3(pBBR1) and TVV3(pBBR1-*attM*) (**Figure 2.3A, lanes 1 and 2**). When these extracts were subjected to 2D-PAGE, slight differences in the accumulation of about ten proteins were observed (data not shown).

On the contrary, numerous soluble intracellular proteins appeared to be differentially expressed between B518(pBBR1) and B518(pBBR1-*attM*) (**Figure 2.3A, lanes 3 and 4**). The impact of inactivating AHLs was investigated on other cellular compartments for B518; some surface-associated (**Figure 2.3B, lanes 1 and 2**) and secreted proteins (**Figure 2.3B, lanes 3 and 4**) appeared also to be differentially expressed. These results imply that QS controls positively or negatively the expression of many proteins in B518. These results were further confirmed by 2D-PAGE for soluble intracellular proteins (**Figure 2.4A and 2.4B**) and extracellular proteins (**Figure 2.4C and 2.4D**). Among the approximately 460 spots resolved for the intracellular fractions, 2D image analysis revealed that 46 spots were found only in B518(pBBR1) extracts whereas 36 spots were specifically found in B518(pBBR1-*attM*) extracts (**Figure 2.4A and 2.4B**). The extracellular fractions contained about 200 proteins, 21 spots and 19 spots were specific to respectively B518(pBBR1) and B518(pBBR1-*attM*) extracts (**Figure 2.4C and 2.4D**). Next to proteins whose production is completely turned on or turned off, other proteins were present at different intensities when comparing B518(pBBR1) and B518(pBBR1-*attM*) (**Figure 2.4**), indicating that QS regulation is not an ON/OFF regulation in those cases. Altogether these results suggest that QS is a master regulation system in B518.

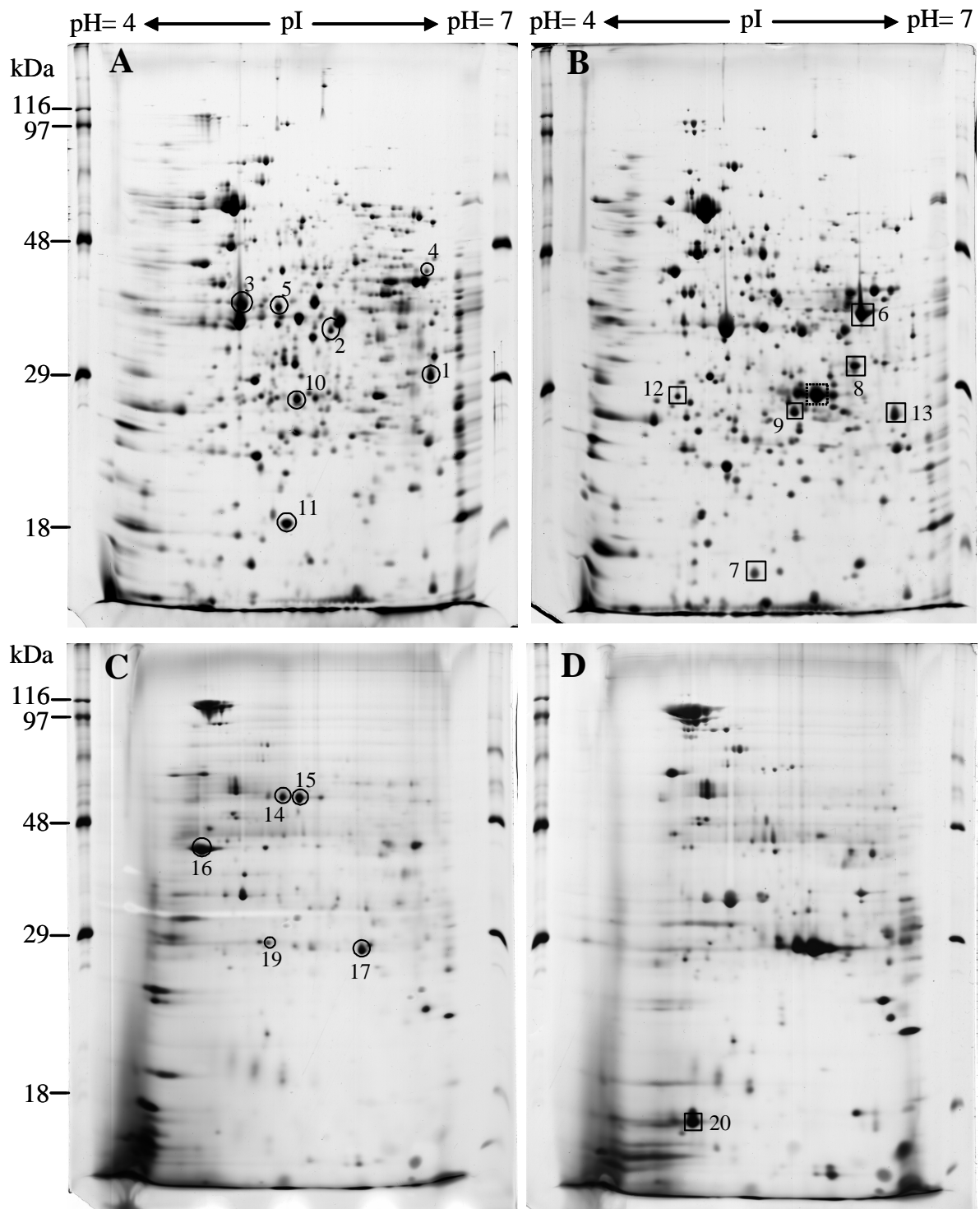


Figure 2.4: 2D-PAGE analysis of intracellular and extracellular proteins of *A. lipoferum* B518(pBBR1) and B518(pBBR1-attM) strains.

A and B, intracellular proteins of respectively B518(pBBR1) and B518(pBBR1-attM). C and D, extracellular proteins of respectively B518(pBBR1) and B518(pBBR1-attM). Isoelectric focusing in the first dimension was carried out on a linear pH gradient (4 to 7), followed by a second separation on 12% acrylamide SDS-PAGE gels. Proteins were revealed by silver staining. Encircled spots represent proteins absent from B518(pBBR1-attM) and subsequently identified; boxed spots represent proteins absent in B518(pBBR1) and subsequently identified. Dotted box designates the AttM protein.

Identification of QS regulated proteins in *A. lipoferum* B518.

As the genome of B518 is not available, a classical peptide mass fingerprinting could not be conducted to characterize some QS-regulated proteins. So, thirty abundant proteins displaying strong QS up- or down-regulation, were selected for LC-ESI/MS/MS analysis for putative identification. The peptides sequences obtained were compared with protein databases and with the draft genome of the non-AHL producing strain *A. lipoferum* 4B that became available at the end of this study (**Table 2.3**). Peptide sequences could not be obtained for eleven proteins.

Among the intracellular QS-upregulated proteins, ChvE, a protein involved in sugar chemotaxis, was identified (**Table 2.3; spot N°5 in Figure 2.4A**). Some structural components involved in amino acid active transport displayed QS regulation, with the induction of a high-affinity branched-chain amino acid transporter (spot N°4) and the repression of a lysine/arginine/ornithine transporter subunit (spot N°13). Interestingly, MS/MS peptides of the two large spots 3 and 6 respectively present only in the B518(pBBR1) and in the B518(pBBR1-*attM*) patterns, matched with the same protein, the major outer protein OmaA.

Like in other global approaches, several proteins involved in central metabolism, such as glycolysis (triose phosphate isomerase, spot N°9), TCA cycle (succinyl-CoA synthetase, spot N°1) and lysine biosynthesis (aspartate-semialdehyde dehydrogenase, spot N°2, and dihydrodipicolinate synthase, spot N°8) were also identified, indicating that QS is a major regulatory system.

Identification of some QS extracellular up-regulated proteins revealed a protein homologous to flagellin Laf1 (spot N°16) involved in swarming motility in *Azospirillum* (Moens *et al.*, 1995), glutamine synthase (spot N°14) involved in ammonium assimilation and tryptophan synthase alpha chain (TrpA) that together with TrpB catalyzes the last step of tryptophan biosynthesis. However, glutamine synthase and TrpA are intracellular enzymes; such contaminations of extracellular extracts by intracellular proteins is likely due to some cell lysis or leakage during protein preparations, a situation often described in proteomic approaches (Riedel *et al.*, 2006).

Table 2.3: Identification by LC-ESI/MS/MS peptide sequencing of proteins induced or repressed by quorum-sensing in *A. lipoferum* B518.

Fraction ^a	QS regulation	Spot number	Best match with <i>A. lipoferum</i> 4B protein database	Nm/Nt ^b	MW ^c	pI ^c
IC	induction	1	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	2/2	29.9	6.22
IC	induction	2	Aspartate-semialdehyde deshydrogenase	2/3	36.6	5.56
IC	induction	3	Major outer membrane protein OmaA-like	4/6	37.9	5.12
IC	induction	4	High-affinity branched-chain amino acid ABC transporter	3/4	38.9	7.57
IC	induction	5	Multiple sugar-binding periplasmic receptor ChvE	18/19	39.5	8.35
IC	induction	10	Putative extra-cytoplasmic solute receptor	1/4	34.1	6.01
IC	induction	11	Ribonuclease ^d	1/1		
IC	repression	6	Major outer membrane protein OmaA-like	3/5	37.9	5.12
IC	repression	7	Putative endoribonuclease (protein synthesis inhibitor)	3/3	16.3	5.57
IC	repression	8	Dihydrodipicolinate synthase	3/3	30.6	6.06
IC	repression	9	Triosephosphate isomerase	2/2	25.6	5.51
IC	repression	12	No homology	0/3		
IC	repression	13	lysine/arginine/ornithine transporter subunit (ABC superfamily)	1/2	29.7	8.38
EC	induction	14	Glutamine synthetase I GlnA	8/8	52.1	5.17
EC	induction	15	ABC-type cobalt transport system ^e	1/1		
EC	induction	16	Flagellin Laf1	8/8	43.3	4.74
EC	induction	17	Putative ABC transporter	1/1	38.6	7.07
EC	induction	19	Tryptophan synthase alpha chain	3/4	28.9	4.80
EC	repression	20	No homology	0/1		

^a IC, intracellular soluble proteins; EC, protein extracted from culture supernatant.

^b Nm, number of peptides with significant similarities; Nt, total number of peptides obtained by LC-ESI/MS/MS.

^c Molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) were theoretically calculated for best matching protein in 4B protein database with ProtParam software (Gasteiger *et al.*, 2005).

^d The only peptide obtained displays 100% identity with a portion of ribonuclease III of *Bacillus clausii* KSM-K16 (MS-Homology results).

^e The only peptide obtained displays 100% identity with a portion of ABC-type cobalt transport system of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (MS-Homology results).

Discussion

AttM-mediated inactivation of AHL signals in *A. lipoferum*.

In this work, a quorum-quenching approach based on ectopic expression of a lactonase was used to study QS-regulated functions in *A. lipoferum*. Such an approach was successfully conducted before in *Erwinia carotovora* and *Burkholderia cepacia* (Carlier *et al.*, 2003; Wopperer *et al.*, 2006) and proved to be a good alternative to the characterization of QS genes or to a more laborious construction of null mutants.

Preliminary experiments with *aiiA* from *Bacillus* spp. did not allow AHL inactivation in *A. lipoferum*, probably due to the high divergence in codon usage (data not shown). By expressing the AttM lactonase of *Agrobacterium tumefaciens*, a bacterium that like *Azospirillum* belongs to the alpha class of proteobacteria, AHL inactivation was achieved; this can be correlated to the high level of expression of AttM and to its ability to inactivate a wide range of AHLs (Carlier *et al.*, 2003).

Effects of AHL inactivation on pectinase activity and plant-growth promoting ability.

Several hypothesis can account for the reduced auxin production in B518(pBBR1-*attM*). First, induction of IAA synthesis is dependent on tryptophan, the main precursor of IAA, oxygen and IAA concentrations (Ona *et al.*, 2005), and QS might exert an indirect regulation through the modulation of some of these factors. Second, the proteomic approach revealed that TrpA, an enzyme involved in the last step of tryptophan biosynthesis, is repressed by QS. Third, the expression of several transporters appeared to be under QS regulation and these could internalize tryptophan or more likely secrete IAA, as IAA production is reduced in a *A. brasilense omaA* mutant (Xie *et al.*, 2005). However, as a significant amount of auxine is still produced by B518(pBBR1-*attM*) and as auxine act positively on root elongation at very low concentrations (Tien *et al.*, 1979), the reduced auxin production of B518(pBBR1-*attM*) was expected to have no or little impact on plant growth-promoting ability.

Interestingly, the abolition of pectinase activity did not prevent B518(pBBR1-*attM*) to exert phytobeneficial effects; thus the ability to penetrate root tissue is not required to promote plant growth and pectinolytic activity might just contribute to provide nutrients by a tenuous degradation of plant cell wall (Dobbelaere *et al.*, 2003). The corresponding enzyme(s) might be produced at a very low level in order to avoid the triggering of the plant defense system; since only abundant proteins were subjected to MS/MS in our study, it was of no surprise to omit the spot coinciding to pectinase in extracellular extracts.

The fact that AHLs are not implicated in the regulation of phyto-stimulatory effect of *A. lipoferum* is an interesting result as many bacteria possessing AHL de-activating enzymes are rhizosphere inhabitants (Reimann *et al.*, 2002; Uroz *et al.*, 2003). Moreover, QS in the rhizosphere can also be disrupted by abiotic factors, such as alkaline pH, and by biotic factors, such as AHL mimics produced by some plants (Teplitski *et al.*, 2000). So, agronomic performances of *Azospirillum* should not be affected by the aforementioned parameters, unlike that of the pseudomonads whose biocontrol properties are regulated by QS (Molina *et al.*, 2003).

Functions of potential importance for rhizosphere competence and root colonization by *Azospirillum*.

QS was previously shown to regulate swarming motility in diverse bacteria, notably in *Serratia marcescens* (Eberl *et al.*, 1996) and *Yersinia enterocolitica* (Atkinson *et al.*, 2006). In *A. lipoferum*, swarming and swimming motilities on semi-solid agar plates were not affected by AHL inactivation. However, synthesis of Laf, the main structural component of the lateral flagella responsible for swarming motility in *A. lipoferum*, is impaired in B518(pBBR1-*attM*), as revealed by the proteomic analysis. Thus, unlike what occurs in a *lafI* mutant of *A. brasilense* Sp7 that has lost its ability to swarm (Moens *et al.*, 1995), B518 retains its ability to swarm despite the lack of Laf; this could be explained by the putative QS-independent production of biosurfactants implicated in bacterial swarming, such as serrawetin in *S. marcescens* (Lindum *et al.*, 1998).

Not surprisingly, the *A. lipoferum* AHL producers express siderophore-mediated iron transport systems like many soil bacteria that have to compete with other microorganisms for the limited available iron. QS seems to regulate negatively siderophore synthesis in B518, whereas no regulation was observed in TVV3. In soil, where AHL concentration is low due to low population density, high diffusion or AHL inactivation, B518 would produce siderophores and will be more competitive in acquiring iron. QS-regulation of siderophore synthesis is likely to be indirect and appears to be partial as stationary phase cells of the wild-type strain make siderophores. Such a regulation of siderophore production was previously reported for human opportunistic pathogens; a *cepR* mutant of *Burkholderia cepacia* displays a 67% increase in the production of the siderophore ornibactin (Lewenza *et al.*, 1999).

Among the seventeen QS-regulated proteins that could be successfully identified, six are proteins with putative functions associated with metabolite transport (porins or components of ABC transporters). Interestingly two spots matching with the OmaA porin were found to be differentially regulated (up-regulation for spot N°3 and down-regulation for

spot N°6). These spots could correspond to two different but highly homologous proteins encoded by related genes or to two charge isoforms of the same protein suggesting that QS affects the synthesis or the persistence of the different isoforms of this protein; such a case was previously reported with the RhiA protein of unknown function of *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Cantero *et al.*, 2006). In *A. brasilense* Cd, OmaA is implicated in root adhesion and in cellular aggregation (Burdman *et al.*, 2001); interestingly B518(pBBR1-*attM*) was more prone to flocculation than the wild-type strain (data not shown), a phenotype that might be due to OmaA overexpression (spot N°6).

One of the intracellular up-regulated proteins, ChvE, has a major role in chemotaxis towards sugars and its expression is induced by root exudates in two *A. brasilense* strains (Sp7 and Sp245) (Van Bastelaere *et al.*, 1999). QS regulation of ChvE could be a mean to detect new sources of nutrients when such a need becomes necessary (i.e. at high population density). Whether OmaA and ChvE also play a role in root colonization by *A. lipoferum* B518 *in vivo* remains to be established. However, the fact that proteins linked to transport and chemotaxis were found to be affected by AHL inactivation strongly suggests that QS is dedicated to regulate functions involved in root colonization, which are likely to be occulted in our *in vitro* plant assays.

The fact that the genome of B518 is not sequenced prevented our proteomic analysis to be exhaustive; indeed, it was not possible to use MALDI-TOF mass spectrometry to identify the numerous proteins that seem to be under QS regulation and to make a correlation with the QS-regulated phenotypes.

Specificity of the QS regulons in *Azospirillum*.

Results obtained in this study point to the existence of two distinct QS networks in the two *A. lipoferum* strains studied, despite nearly identical protein contents (**Figure 2.3, compare lanes 1 and 3**). Several phenotypes and numerous proteins are clearly regulated by QS in B518 whereas none of the tested phenotypes was affected in TVV3 deficient for QS regulation. Moreover, the spectrum and the quantity of AHLs produced by B518 and TVV3 are quite different and QS genes involved in AHL production are not closely related (Vial *et al.*, 2006). Several previous findings also point to the fact that the QS genes of *A. lipoferum* TVV3 (*alpR-alpI*) might have been acquired by horizontal gene transfer (Vial *et al.*, 2006). Interestingly, pectinase activity, siderophore production and IAA synthesis were not affected when expressing the AttM lactonase in *A. lipoferum* B510 (data not shown), a strain also isolated as a rice endophyte and displaying the same AHL pattern than B518 (Elbeltagy *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2006). Thus, QS regulation in *A. lipoferum* is highly strain-specific.

Acknowledgements

We are grateful to Denis Faure (Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette, France) for providing the initial *attM*-containing plasmid. We thank Michel Becchi (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, Université Lyon 1, France) for MS-MS analysis and Guy Condemine (UMR 5240, Microbiologie, Pathogénie et Adaptation, Université Lyon 1, France) for critical reading of the manuscript. We are grateful to IRRI (International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines) for providing rice seeds, to Génoscope (French national sequencing centre) for preliminary access to the *A. lipoferum* 4B genome, to Emilie Mathiotte for technical help and to Emeline Combes-Meynet for advice for IAA assays. This work was supported by a fellowship from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Nouvelles Technologies to M. B.

References

- Arahou, M., Diem, H. G. & Sasson, A. (1998).** Influence of iron depletion on growth and production of catechol siderophores by different *Frankia* strains *World J Microbiol Biotechnol* **14**, 31-36.
- Atkinson, S., Chang, C. Y., Sockett, R. E., Camara, M. & Williams, P. (2006).** Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol* **188**, 1451-1461.
- Burdman, S., Dulguerova, G., Okon, Y. & Jurkevitch, E. (2001).** Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**, 555-561.
- Cantero, L., Palacios, J. M., Ruiz-Argueso, T. & Imperial, J. (2006).** Proteomic analysis of quorum sensing in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S97-S106.
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y. & Faure, D. (2003).** The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4989-4993.
- Chen, H., Teplitski, M., Robinson, J. B., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. (2003).** Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J Bacteriol* **185**, 5029-5036.

- Chin-A-Woeng, T. F., van den Broek, D., de Voer, G., van der Drift, K. M., Tuinman, S., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. & Bloemberg, G. V. (2001).** Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 969-979.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003).** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* **22**, 107-149.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C. & other authors (1996).** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127-136.
- El Zemrany, H., Cortet, J., Lutz, M. P. & other authors (2006).** Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol Biochem* **38**, 1712-1726.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2001).** Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5285-5293.
- Fontana, S., Alessandro, R., Barranca, M., Giordano, M., Corrado, C., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Kohn, E. C. & De Leo, G. (2007).** Comparative proteome profiling and functional analysis of chronic myelogenous leukemia cell lines. *J Proteome Res* **6**, 4330-4342.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995).** A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **61**, 793-796.
- Haas, D., Keel, C. & Reimmann, C. (2002).** Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 385-395.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. (1999).** Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**, 748-756.
- Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998).** N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular

lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384-6388.

Moens, S., Michiels, K., Keijers, V., Vanleuven, F. & Vanderleyden, J. (1995). Cloning, Sequencing, and Phenotypic Analysis of Laf1, Encoding the Flagellin of the Lateral Flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Bacteriol* **177**, 5419-5426.

Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B. & Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 71-81.

Newton, J. A. & Fray, R. G. (2004). Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* **6**, 213-224.

Ona, O., Van Impe, J., Prinsen, E. & Vanderleyden, J. (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 125-132.

Park, S. R., Cho, S. J. & Yun, H. D. (2000). Cloning and sequencing of *pel* gene responsible for CMCase activity from *Erwinia chrysanthemi* PY35. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 925-930.

Pierson, L. S., 3rd, Keppenne, V. D. & Wood, D. W. (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* **176**, 3966-3974.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. & Sa, T. (2007). Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. *Res Microbiol* **158**, 287-294.

Pothier, J. F., Prigent-Combaret, C., Haurat, J., Möenne-Loccoz, Y. & Wisniewski-Dyé, F. (2008). Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene *nirK* in the wheat-associated plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Mol Plant Microbe Interact* **21**.

Rabilloud, T. (1999). Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297-305.

Reimmann, C., Ginot, N., Michel, L. & other authors (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**, 923-932.

- Riedel, K., Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Gorg, A., Lottspeich, F. & Eberl, L. (2003). Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cenocepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis* **24**, 740-750.
- Riedel, K., Carranza, P., Gehrig, P., Potthast, F. & Eberl, L. (2006). Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: setting up a 2-DE reference map. *Proteomics* **6**, 207-216.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066-2079.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L. & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6036-6041.
- Teplitski, M., Robinson, J. B. & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 637-648.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H. & Hubbell, D. H. (1979). Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* **37**, 1016-1024.
- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D. & Dessaux, Y. (2003). Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**, 1981-1989.
- Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P. & Vanderleyden, J. (1999). Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Mol Microbiol* **32**, 703-714.
- Van, V. T., Ngoke, S., Berge, O., Faure, D., Bally, R., Hebbar, P. & Heulin, T. (1997). Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. *Can J Microbiol* **43**, 486-490.

Vial, L., Cuny, C., Gluchoff-Fiasson, K., Comte, G., Oger, P. M., Faure, D., Dessaux, Y., Bally, R. & Wisniewski-Dyé, F. (2006). *N*-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. *FEMS Microbiol Ecol* **58**, 155-168.

Wopperer, J., Cardona, S. T., Huber, B., Jacobi, C. A., Valvano, M. A. & Eberl, L. (2006). A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1579-1587.

Xie, B. E., Xu, K., Zhao, H. X. & Chen, S. F. (2005). Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **248**, 57-63.

Zhou, H., Yao, F., Roberts, D. P. & Lessie, T. G. (2003). AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. *Curr Microbiol* **47**, 174-179.

Chapitre III :

**Caractérisation et régulation de gènes
d'origine phagique adjacents aux gènes
impliqués dans le QS chez *A. lipoferum* TVV3**

Chapitre III : Caractérisation et régulation de gènes d'origine phagique adjacents aux gènes impliqués dans le QS chez *A. lipoferum* TVV3

1. Introduction

Initialement la production d'AHLs avait été mise en évidence chez quatre souches d'*Azospirillum* appartenant à l'espèce *lipoferum* et isolées de la rhizosphère du riz (Vial *et al.*, 2006a). Cette étude avait révélé deux profils distincts de production d'AHLs tant par la nature des molécules produites que par la quantité, et avait suggéré l'existence de deux systèmes *luxR/luxI* non homologues chez les souches TVV3 et B518.

Afin d'identifier les gènes régulés par QS chez *A. lipoferum*, une approche par quorum-quenching visant à inactiver les signaux de type AHL a été entreprise avec succès (cf. chapitre 2) : pour les souches exprimant l'enzyme inactivant les AHLs (la lactonase), la production d'AHL n'est plus détectable. Notre analyse globale par protéomique (comparaison des profils protéiques entre souches sauvages et souches exprimant la lactonase) a montré que les fonctions régulées par ces deux systèmes *luxR/luxI* étaient également distinctes. Chez la souche *A. lipoferum* B518, des dizaines de protéines différentiellement exprimées entre la souche sauvage et la souche exprimant la lactonase ont été mises en évidence ; la caractérisation de certaines protéines différentiellement exprimées ainsi que l'étude de phénotypes ciblés (notamment activité pectinase) a révélé que le QS pourrait réguler des fonctions impliquées dans la colonisation racinaire et la compétence rhizosphérique ou dans l'adaptation d'*Azospirillum* à la racine des plantes. Pour la souche *A. lipoferum* TVV3, aucun des phénotypes testés ne s'est avéré être régulé par QS et seulement quelques modifications des profils protéiques (au niveau de l'intensité de certaines protéines) ont été mises en évidence entre la souche sauvage et la souche ne produisant pas d'AHLs. Les quelques protéines différentiellement exprimées n'ayant pas été caractérisées, notre étude n'a donc pas permis de mettre en évidence des fonctions régulées par QS chez la souche TVV3.

Chez de nombreuses bactéries, les gènes régulés par QS sont situés dans l'environnement génétique des gènes de type *lux*. Ainsi, chez *Vibrio fischeri*, le premier exemple décrit de QS, les gènes *luxR* et *luxI* permettant de contrôler la production de bioluminescence sont situés en amont de l'opéron *luxCDABEG*. Les gènes de type *luxR* et *luxI* chez *Pseudomonas aureofaciens* et *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* contrôlent respectivement la synthèse de phénazine et de carbapénème, composés antibiotiques dont les

gènes de biosynthèse sont adjacents à leur gène de type *luxR* correspondant (McGowan *et al.*, 2005; Pierson *et al.*, 1994). Les gènes *alpR* et *alpI* (homologues respectivement de *luxR* et *luxI* chez TVV3), sont localisés sur un petit plasmide de 85 kb, la souche TVV3 possédant au moins huit plasmides dont les tailles varient de 15 à plus de 700 kb (Vial *et al.*, 2006a). Lorsque les gènes de type *lux* sont présents sur un plasmide, les fonctions régulées par QS peuvent être localisées sur ce même plasmide. C'est notamment le cas chez *A. tumefaciens* et chez *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* pour lesquelles les gènes *tra* impliqués dans le transfert respectivement du plasmide Ti et du plasmide symbiotique sont régulés par les gènes *traR* et *traI* localisés à proximité sur ces mêmes plasmides (Wilkinson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1993). Chez TVV3, la régulation de l'expression de certains gènes par le QS pourrait être limitée à certains gènes présents sur le plasmide de 85 kb, ce qui expliquerait le faible nombre de protéines différentiellement exprimées observées sur gel 2D, entre la souche sauvage et la souche exprimant une lactonase (cf. chapitre 2). Des séquences d'environ 2 kb de part et d'autre de ces gènes avaient été initialement obtenues dans le but d'identifier des gènes cibles régulés par QS (Vial, 2005). L'analyse de cette région contenant les gènes *alp* avait révélé la présence de trois ORFs (un en amont de *alpR* et deux en aval de *alpI*) dont les séquences protéiques déduites présentaient des homologies avec des protéines phagiques. Le regroupement de plusieurs ORFs codant potentiellement des protéines phagiques semblait donc indiquer l'insertion d'un prophage dans cette région. En parallèle, des particules phagiques avaient pu être mises en évidence après l'induction des cultures de TVV3 à la mitomycine C (Vial, 2005). Cependant, ces travaux initiaux n'avaient pas pu permettre d'établir un lien entre les gènes de prophage adjacents à *alpR/alpI* et la production de particules phagiques.

Afin d'obtenir des informations complémentaires sur l'environnement des gènes *alp*, nous avons pu en collaboration avec le Génoscope (Centre National de Séquençage) obtenir la séquence complète d'une région d'environ 29 kb clonée dans un cosmide utilisé pour la caractérisation des gènes *alp*. La caractérisation de la séquence obtenue a confirmé la présence d'ORFs phagiques sur une région d'au moins 15 kb et a permis de cibler des gènes potentiellement régulés par QS. L'expression de certains ORFs adjacents à *alpR/alpI* a pu être analysée par RT-PCR semi-quantitative dans la souche de TVV3 sauvage et dans la souche contenant une lactonase, afin de déterminer si le QS pouvait réguler l'expression de ces ORFs. En parallèle, la caractérisation des particules phagiques formées à partir de cultures de TVV3 induites à la mitomycine C a été approfondie, afin de déterminer si leur production pouvait résulter de l'induction d'un phage tempéré, présent sous forme de prophage dans l'environnement des gènes *alp*.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Souches bactériennes et conditions de cultures

Les souches bactériennes d'*Azospirillum* utilisées dans cette étude sont : *A. lipoferum* TVV3, souche isolée de la rhizosphère du riz au Vietnam (Trân Vân *et al.*, 1997) ; TVV3(pBBR1-*attM*), souche comportant le plasmide pBBR1-MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) dans lequel a été cloné le gène *attM* d'*Agrobacterium tumefaciens*, sous la dépendance du promoteur constitutif *PnptII* (cf. chapitre 2) ; TVV3(pBBR1), souche comportant le plasmide sans insert. Les souches d'*Azospirillum* ont été cultivées à 28°C en milieu LBm (Luria-Bertani modifié contenant 5 g de NaCl par litre) (**Annexe 1**), et en présence de kanamycine à une concentration de 40 µg/ml pour les deux souches hébergeant des plasmides. La souche d'*Escherichia coli* contenant le cosmide pR1.4, cosmide dans lequel est cloné une région d'ADN de la souche TVV3 contenant les gènes *alpR* et *alpI* (Vial *et al.*, 2006a), a été cultivée en milieu LBm à 37°C en présence de tétracycline à une concentration de 10 µg/ml. Pour les expériences de clonage et de séquençage, *E. coli* contenant les plasmides recombinants a été cultivée en milieu 2YT (extrait de levure, 5 g/l ; tryptone, 16 g/l ; NaCl, 5 g/l) à 37°C en présence de chloramphénicol à 100 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989)

2.2. Séquençage d'ADN et analyses bioinformatiques

Pour le séquençage du cosmide pR1.4, le kit NucleoBond PC500 associé au kit NucleoBond Finalizer Plus (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) ont été utilisés pour préparer une quantité importante d'ADN à partir de 250 ml de culture bactérienne. Pour le séquençage de l'ADN phagique extrait à partir des particules phagiques issues de cultures d'*A. lipoferum* TVV3 induites à la mitomycine C, le protocole décrit au paragraphe 2.5. a été utilisé. L'ADN à séquencer a tout d'abord subi une fragmentation mécanique et des fragments obtenus d'environ 10 kb ont ensuite été clonés dans le plasmide à faible nombre de copies pCNS (pSU18 modifié) (Bartolomé *et al.*, 1991). Les plasmides recombinants ont été purifiés et les fragments d'ADN clonés ont été séquencés sur un séquenceur de type ABI3730xl. 720 et 28 séquences ont été générées à partir des clones contenant respectivement les fragments d'ADN du pR1.4 et les fragments d'ADN du phage de TVV3. Les logiciels Phred/Phrap/Consed (www.phrap.com) ont été utilisés pour vérifier la qualité des séquences obtenues et permettre leur assemblage. Les étapes de fragmentation, clonage d'ADN, séquençage et assemblage ont été effectuées au Génoscope (Centre National de Séquençage, Evry) dans le cadre d'une collaboration.

Tableau 3.1 : Amorces utilisées dans cette étude.

Désignation	Séquence (5'-3')	Position*
ORF 5		
F3340rtx	GACCGGGACCGAGGATAC	987 à 1004
F3343	GACGGTCTGGGAGGAGACAC	1206 à 1187
ORF 7		
F3340	ACGTTCGGGTTCTCGATTTT	184 à 203
F3341	GGAGGGACAGAAATTGCGTA	-13 à 7
ORF 10 (<i>alpR</i>)		
F1890	ATCGATCCTGTTGTTCTT	229 à 246
F1891	GATNCCCTGCTGGATCGCCTT	690 à 671
ORF 11 (<i>alpI</i>)		
F3848	CACCTGGAAAACCATCCATC	18 à 37
F3849	GGGAACAGCTCTTCAAGCAT	251 à 232
ORF 12		
F3744	GATCGATGAGGTCGAGCATT	225 à 244
F3745	GTCGCTCTCATTGGTCTGGT	450 à 431
<i>ARNr16S</i>		
PA	AGAGTTTGATCCTGGCTGAG	8 à 27
PH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1541 à 1522
<i>nifH</i>		
polF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	115 à 135
polR	GATGCTGTTCTTGTCCGAGC	476 à 456
GeneAmplimer pAW 109 RNA		
F3831	CATGTCAAATTTCACTGCTTCATC	
F3832	TGACCACCCAGCCATCCTT	

* La position est déterminée à partir du premier nucléotide du codon initiateur de la traduction des différents ORFs : ORF 5, ORF 7, ORF 10 (*alpR*), ORF 11 (*alpI*) et ORF 12 du pR1.4. ; *nifH* d'*Azotobacter vinelandii* (M20568). Pour l'ADNr16S d'*E. coli*, la position 1 indique le premier nucléotide du gène. Pour le GeneAmplimer pAW 109 RNA, les amorces ont été choisies d'après Wisniewski et Rogowski, 2004.

Les cadres ouverts de lecture (ORFs) sur les séquences assemblées ont été prédits à l'aide du logiciel Glimmer 2.0 (Delcher *et al.*, 1999) et annotés à l'aide du logiciel ARTEMIS 8 (Rutherford *et al.*, 2000). Dans nos analyses, les ORFs putatifs contenaient les codons AUG (méthionine), UUG (leucine), ou GUG (valine) comme codon initiateur de la traduction. Les séquences des protéines prédites ont été comparées avec celles des banques de données de protéines de NCBI en utilisant l'algorithme BLASTX (Altschul *et al.*, 1997). Le logiciel INTERPROSCAN a été utilisé pour rechercher des domaines conservés dans les séquences de protéines prédites (Zdobnov & Apweiler, 2001).

2.3. Amplification par PCR

Les amplifications d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été effectuées selon les instructions du fournisseur de la Taq polymérase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) dans un volume final de 50 μ L. Par tube, le milieu réactionnel était composé de dNTP (2,5 μ M), de 5 μ L de tampon PCR 10x fourni par le fabricant (1x), de 2,5 unités de Taq polymérase, de 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM (fourni avec l'enzyme) (1,5 mM), de 5 μ L de chacune des deux amorces (1 μ M). A cette solution, un volume correspondant à environ 100 ng d'ADN a été ajouté ainsi que de l'eau ultra pure qsp 50 μ L. Les conditions de réaction ont été les suivantes : une étape de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 5 min) suivie de 35 cycles d'amplification comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 30 s) une étape d'hybridation des amorces (T_m -5°C pendant 30 s) et enfin une étape d'élongation (72°C pendant 30 s). Le mélange a ensuite été maintenu à 72°C pendant 7 min pour terminer l'élongation. La température fixée pour l'étape d'hybridation était spécifique de chaque couple d'amorces. Les PCR ont été effectuées avec un thermocycleur Biometra (Whatman Biometra, Goettingen, Allemagne). Les différents oligonucléotides utilisés au cours de ce travail (**Tableau 3.1**) ont été obtenus auprès de Proligo (Proligo, Paris, France).

2.4. RT-PCR

2.4.1. Conditions de culture et préparation de culots bactériens

Afin de comparer le niveau d'expression de certains ORFs adjacents à *alpR/alpI* dans les trois souches bactériennes, TVV3, TVV3(pBBR1) et TVV3(pBBR1-*attM*), des cultures ont été réalisées dans 25 mL de milieu LBm. Lorsque l'absorbance des cultures avait atteint une valeur de 1.3 correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance dans ce milieu, un volume de 5 mL a été prélevé et centrifugé à 5000 rpm pendant 15 min à 20°C. Après élimination du surnageant, les culots ont été plongés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

2.4.2. Extraction des ARNm

Les ARNm ont été extraits selon la méthode décrite en **Annexe 2**. L'élimination de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit DNA FreeTM (Ambion, Austin, USA). Les échantillons ont subi au minimum deux traitements à la DNase (3 µL par échantillon) de 45 min à 37°C ; la DNase a ensuite été inactivée par l'ajout de 15 µL de tampon d'inactivation. Les échantillons ont été centrifugés 1 min à 12000 rpm à 4°C et les surnageants contenant les ARNs purifiés ont été stockés à -80°C. Après chaque traitement à la DNase, l'absence d'ADN a été vérifiée par une amplification PCR du gène *nifH* (avec les amorces décrites dans le **Tableau 3.1**) et selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.

L'étape de « reverse-transcription », permettant d'obtenir des ADNc à partir des ARNs purifiés, a été réalisée à l'aide du kit Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Un témoin interne, le plasmide pAW 109 RNA (provenant du kit GeneAmp^R RNA PCR, Applied Biosystem, Foster City, USA), a été ajouté en quantité connue ($1,25 \times 10^5$ copies) aux échantillons d'ARN, afin de vérifier l'efficacité de la reverse-transcription par une amplification PCR (avec les amorces décrites dans le **Tableau 3.1**). Les concentrations en ADNc ont été déterminées pour chaque échantillon ; 50 ng ont été utilisés pour les amplifications PCR menées selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2., excepté le nombre de cycles qui était variable selon le gène amplifié afin que l'amplification soit arrêtée dans la phase exponentielle.

2.5. Induction à la mitomycine C et extraction de l'ADN phagique

L'induction des particules phagiques a été réalisée en ajoutant de la mitomycine C (concentration finale, 0.1 µg/ml) à 25 ml de culture d'*A. lipoferum* TVV3 en milieu LBm lorsque la culture avait atteint une DO₅₈₀ de 0.3. Les cultures ont ensuite été incubées pendant 16 h à 28°C après l'ajout de la mitomycine C. Les cellules et les débris bactériens ont été éliminés par deux centrifugations successives à 5000 × g pendant 10 min à 20°C. Le surnageant a été incubé pendant 1 h à 37°C avec 100 µg de DNase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) pour digérer l'ADN de l'hôte bactérien. Après addition et dissolution complète de NaCl à une concentration finale de 1 M dans le surnageant, ce dernier a été à nouveau centrifugé à 5000 × g pendant 10 min à 20°C. Les particules phagiques ont été précipitées en ajoutant du polyéthylène glycol 8000 (Fluka, Buchs, Switzerland) à 10% (poids/volume). Après 2 h d'incubation à 28°C sous faible agitation, la solution a été centrifugée à 5000 × g pendant 20 min à 20°C ; le culot contenant les phages précipités a été repris par 2 × 500 µl de tampon SM (NaCl, 100 mM ; MgSO₄, 10 mM ; Tris-HCl pH7,5,

50 mM). Les acides nucléiques bactériens présents dans la solution de particules phagiques ont été éliminés en réalisant plusieurs incubations successives : (i) 30 min à 37°C avec un mélange de DNase I et de RNase (Euromedex, Mundolsheim, France) chacune à une concentration finale de 600 µg/ml ; (ii) 30 min avec de la DNase I (concentration finale, 1,2 mg/ml) ; et (iii) 1 h avec de la DNase I (concentration finale, 2,4 mg/ml). Pour purifier l'ADN présent dans les particules phagiques, ces dernières ont tout d'abord été lysées avec 10 µl de protéinase K (Fermentas, Mundolsheim, France), 65 µl d'EDTA (0.25 M), et 20 µl de dodécyl sulfate de sodium (10 %). L'ADN phagique a enfin été extrait par des étapes de purification au phénol-chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989), et le culot d'ADN correspondant à 25 ml de culture de départ a été dissous dans 35 µl d'eau ultra-pure.

2.6. Préparation des échantillons pour la MET

L'induction de la production de particules phagiques a été réalisée à partir du protocole décrit au paragraphe 2.5. Les cellules et les débris bactériens ont été éliminés par deux centrifugations successives à 5000 × g pendant 10 min à 20°C. Un volume de 12 ml de surnageant a ensuite été filtré à 0,45 µm (type CA; Millipore, Billerica, MA), transféré dans un tube à centrifuger en polyallomère (14 par 89 mm; Beckman Coulter, Roissy, France) et centrifugé à 4°C pendant 5 h à 75,000 × g. Le culot obtenu contenant les particules phagiques a été solubilisé sans pipetage dans 30 µl de tampon SM. Une goutte de cette suspension a été déposée sur une grille de microscopie électronique portant du formvar-carbone, puis séchée avec un papier filtre. L'échantillon a ensuite été mis en contact pendant 30 s avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 2% servant de contrastant. Après avoir éliminé l'excès de contrastant, la grille a été séchée à l'air et observée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (MET) Philips CM120 réglé à 100 kV (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1).

2.7. Migration de l'ADN phagique en électrophorèse classique et PFGE

La migration en électrophorèse classique de l'ADN phagique purifié (cf. § 2.5) a été réalisée en déposant 100 ng d'ADN natif par puits sur gel d'agarose 0.8%. 100 ng d'ADN phagique purifié ont également été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI, *Bgl*III ou *Eco*RV (Fermentas) selon les recommandations du fournisseur et les fragments obtenus ont également été séparés sur gel d'agarose 0.8%. Pour l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, *Pulse Field Gel Electrophoresis*), la migration de l'ADN phagique purifié et non digéré a été effectuée sur gel d'agarose 1% (agarose spécifique pour l'électrophorèse en champ pulsé, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) à partir de 100 ng d'ADN déposé par puits. La PFGE a

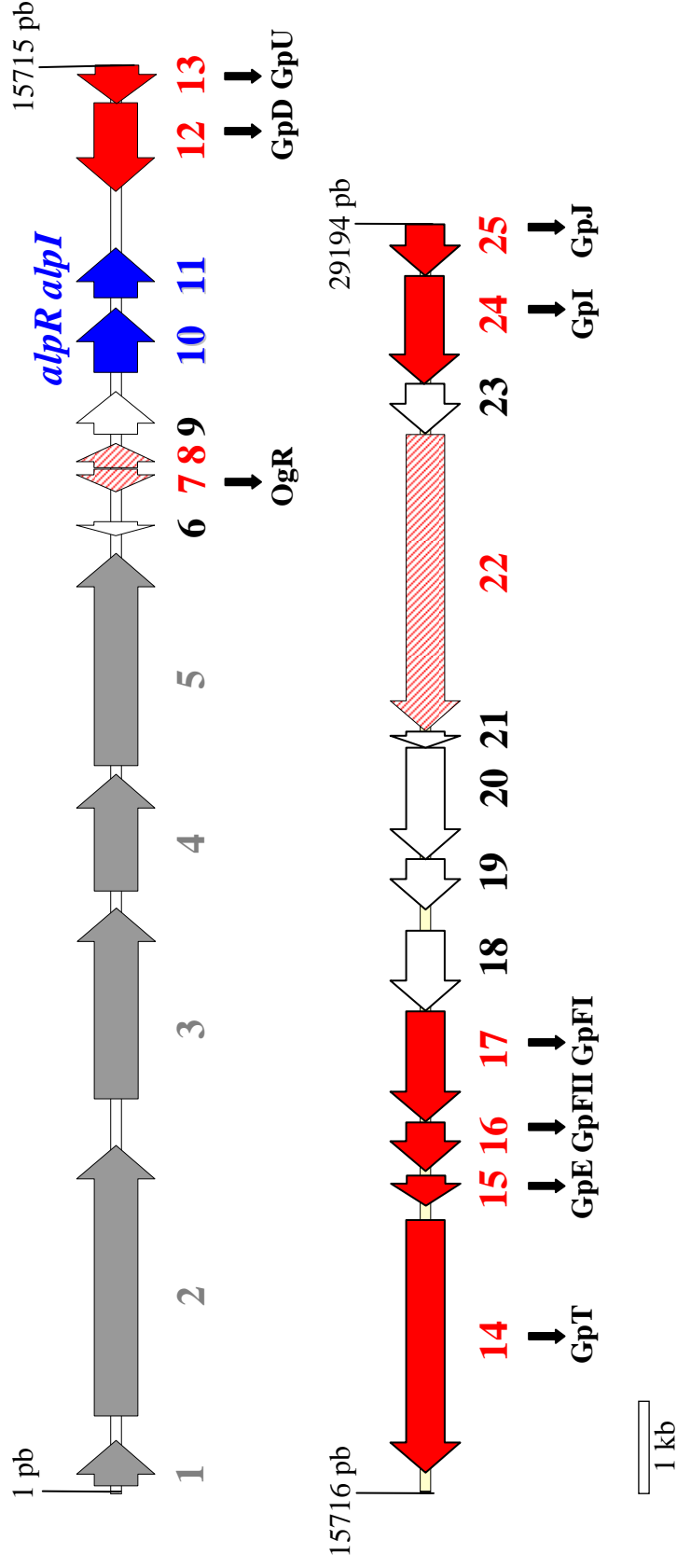


Figure 3.1 : Organisation génétique de la région de 30 kb contenant les gènes *alpR* et *alpI*.

Le double trait noir représente la séquence d'ADN de TVV3 de 30 kb clonée dans le cosmide pR1.4. Les différents ORFs détectés (se référer au tableau 1) sur cette région sont représentés par des flèches. Les flèches bleues représentent les gènes *alpR* et *alpI*. Les flèches grises représentent des ORFs ayant des homologues avec des gènes codant des protéines du métabolisme bactérien. Les flèches rouges et rayées rouges représentent des ORFs ayant des homologues avec des gènes codant respectivement des protéines phagiques et des protéines ayant des domaines conservés de protéines phagiques. Les ORFs n'ayant pas d'homologues dans les banques de données ou dont les homologues n'ont pas de fonctions déterminées sont représentés par des flèches blanches. Les petites flèches noires indiquent les noms des protéines du bactériophage P2 de *E. coli* avec lesquelles des homologues significatives ont été mises en évidence.

été réalisée sur un appareil Chef-DRIII (Bio-Rad Laboratories) avec les paramètres suivants : migration dans un tampon Tris-Borate-EDTA à 14°C, temps d'impulsion initiale de 1 s, temps d'impulsion finale de 6 s, voltage de 6 V/cm, temps de migration de 15 h, angle de 120°. Les gels obtenus ont été colorés avec du bromure d'éthidium et visualisés avec un système Gel-doc 2000 (Bio-Rad Laboratories).

3. Résultats

3.1. Séquençage complet d'une région de 30 kb contenant les gènes *alpR* et *alpI*

Lors de l'isolement des gènes *alpR* et *alpI* (homologues respectivement de *luxR* et *luxI* chez TVV3), les séquences d'environ 2 kb de part et d'autre de ces gènes avaient été initialement obtenues dans le but d'identifier des gènes cibles régulés par QS (Vial, 2005). Trois ORFs (un en amont de *alpR*) et deux en aval de *alpI* avaient été ainsi identifiés et leurs séquences protéiques déduites avaient révélé des homologies avec des protéines phagiques, ce qui semblait indiquer l'insertion d'un prophage dans cette région. Afin d'obtenir des informations complémentaires sur cette région, nous avons pu en collaboration avec le Génoscope (Centre National de Séquençage) obtenir la séquence complète du cosmide pR1.4 contenant les gènes *alpR* et *alpI*. La région clonée dans le cosmide pR1.4 a une taille de 29,194 pb et possède un pourcentage GC de 66.31, ce qui est légèrement inférieur au pourcentage GC décrit pour *Azospirillum* spp. (69% à 71%) (Tarrand *et al.*, 1978). Au total, 25 ORFs codant des protéines composées d'au moins 52 acides aminés, ont été prédits sur cette séquence en utilisant le logiciel Glimmer 2.0 (**Figure 3.1**). La recherche d'homologie entre ces protéines et les protéines des banques de données de NCBI en utilisant l'algorithme BLASTX a indiqué que 6 ORFs codent des protéines hypothétiques, 4 ORFs codent des protéines ayant des homologies avec des protéines hypothétiques rencontrées chez d'autres bactéries, et que 15 ORFs codent des protéines ayant des homologies avec des protéines de fonctions connues (**Tableau 3.2**). Aucun gène codant un ARNt n'a été identifié sur la séquence. L'étude de l'organisation des différents ORFs présents sur cette région a révélé que des ORFs codant des protéines homologues à des protéines impliqués dans la physiologie bactérienne (ORF 1 à 5) sont présents en amont des gènes *alpR* (ORF 10) et *alpI* (ORF 11) alors que des ORFs codant des protéines homologues à des protéines phagiques (ORFs 12 à 17, ORFs 22, 24 et 25) sont majoritairement présents en aval des gènes du QS.

En 5' de la région séquencée, l'ORF 1 coderait une protéine ayant des homologies avec les protéines de type Lrp (*leucine response protein*) ; les protéines de type Lrp sont des régulateurs transcriptionnels impliqués notamment dans la régulation du métabolisme des

Tableau 3.2 : Caractéristiques des ORFs présents sur la région de 30 kb contenant *alpR* et *alpI*.

orf	position	Longueur	% GC	a.a. (kDa)	Fonction prédite	Protéine la plus homologue (Numéro d'accèsion)	% identité a.a. (E value)
orf 1	71-565	495	62.82	164 (18.6)	Protéine de type Lrp	Leucine-responsive regulatory protein [Bradyrhizobium japonicum] (AAL5753.1)	62% (2E-46)
orf 2	840-3818	2979	69.35	992 (106.2)	Protéine de chimiotactisme	Methyl-accepting chemotaxis protein [Magnetospirillum magneticum AMB-1] (YP_422917.1)	35% (E-156)
orf 3	4322-6427	2106	69.99	701 (76.7)	Transporteur ABC de type HlyB	Toxin secretion ABC transporter (ATP-binding and membrane protein); HlyB-like protein [Bradyrhizobium sp. ORS278] (YP_0011208064.1)	59% (0.0)
orf 4	6612-7901	1290	73.56	429 (45.9)	Protéine de sécrétion de type HlyD	Probable Hemolysin secretion protein D [Bradyrhizobium japonicum USDA 110] (NP_772932.1)	34% (1E-53)
orf 5	7995-10337	2343	73.02	780 (75.8)	Adhésine AidA/Toxine de type RTX	Type V secretory pathway, adhesin AidA [Magnetospirillum magneticum AMB-1] (YP_421364.1)	27% (1E-23)
orf 6	10687-10529	159	67.29	52 (5.7)		Hypothetical protein CsaL_1361 [Chromohalobacter salexigens DSM 3043] (YP_573415)	44% (1E-08)
orf 7	11267-11013	255	59.6	84 (9.6)	Activateur transcriptionnel phagique putatif	Hypothetical protein SARI_00525 [Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4:z23:-] (ABX20451.1)	42% (6E-08)
orf 8	11283-11549	267	64.04	88 (9.3)	Régulateur transcriptionnel phagique putatif		
orf 9	11645-12121	477	61.00	158 (17.3)			
orf 10	12332-13036	705	58.86	234 (26.0)	Régulateur transcriptionnel de type LuxR	Transcriptional activator AlpR [Azospirillum lipoferum] (ABD97988.1)	100% (E-133)
orf 11	13157-13702	543	67.40	180 (19.6)	AHL-synthase de type LuxI	Autoinducer synthase AlpI [Azospirillum lipoferum] (ABD97989.1)	100% (7E-86)
orf 12	15294-14323	972	66.66	323 (34.1)	Protéine de queue de phage	Bacteriophage gpD [Ralstonia phage phiRSA1] (YP_001165281.1)	38% (4E-60)
orf 13	15713-15291	423	65.24	140 (15.5)	Protéine d'assemblage de queue de phage	Phage P2 GpU [Azotobacter vinelandii AvOP] (ZP_00419696.1)	49% (2E-30)
orf 14	18410-15723	2688	67.74	895 (93.1)	Protéine d'assemblage de queue de phage	Phage tail tape measure protein, TP901 family [Shewanella baltica OS195] (YP_001555317.1)	30% (3E-97)
orf 15	18874-18554	321	65.42	106 (11.4)	Petite protéine de queue de phage	Phage tail E [Comamonas testosteroni KF-1] (ZP_01517877.1)	35% (1E-07)
orf 16	19438-18923	516	60.46	171 (18.7)	Protéine de la gaine contractile des queues de phages	Phage major tail tube protein [Burkholderia multivorans ATCC 17616] (ZP_01568699.1)	47% (1E-33)
orf 17	20623-19454	1170	65.29	389 (42.0)	Protéine de la gaine contractile des queues de phages	Probable major tail sheath protein [Escherichia coli CFT073] (NP_752901.1)	61% (E-137)
orf 18	21481-20627	855	62.92	284 (30.7)			
orf 19	22242-21709	534	54.86	177 (19.1)			
orf 20	23426-22239	1188	61.70	395 (41.3)			
orf 21	23598-23428	171	63.74	56 (6.0)			
orf 22	26756-23607	3150	67.01	1049 (11.3)	Indéterminée	Virulence-associated protein [Delftia acidovorans SPH-1] (YP_001563621.1)	37% (0.0)
orf 23	27297-26767	531	68.92	176 (19.1)	Indéterminée	Hypothetical protein Daci_2599 [Delftia acidovorans SPH-1] (YP_001563622.1)	41% (4E-17)
orf 24	28448-27294	1155	70.82	384 (41.1)	Protéine de queue de phage	Hypothetical protein WD0284 [Wolbachia endosymbiont of Drosophila melanogaster] (NP_966086.1)	39% (1E-17)
orf 25	28990-28445	546	75.64	181 (18.4)	Protéine d'assemblage de la plaque caudale des phages	Similar to GPJ of phage P2 [Synchococcus elongatus PCC 6301] (YP_171501.1)	45% (1E-28)

acides aminés mais également dans d'autres processus cellulaires comme le transport du maltose ou la biosynthèse des pili, d'après les études réalisées chez *E. coli* (Brinkman *et al.*, 2003; Newman & Lin, 1995). L'ORF 2 coderait une protéine impliquée dans le chimiotactisme de la bactérie ; les protéines de cette famille sont des récepteurs transmembranaires pouvant subir une méthylation réversible en présence de composés chimio-attractant ou chimio-répulsif.

L'ORF 5 coderait une protéine ayant des homologies avec la protéine de type adhésine de *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. Cependant, la protéine prédite à partir de l'ORF 5 ainsi que son homologue chez *M. magneticum* AMB-1 présente des domaines conservés retrouvés également chez les protéines de type RTX (*repeat in toxin*), ce qui suggère que l'ORF annoté comme codant une adhésine chez *M. magneticum* AMB-1 coderait plutôt une protéine de type RTX. Les toxines cytolytiques de type RTX constituent des facteurs de virulence importants qui ont été identifiés chez de nombreuses protéobactéries. Une séquence répétée de dix acides aminés L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X-L/I est retrouvée dix-neuf fois dans la protéine déduite de cet ORF (**Figure 3.2**). La prédiction de la séquence en acides aminés suggère que cette protéine est riche en glycine et en aspartate, ces deux acides aminés représentant près de 40 % de la protéine totale. Chez *E. coli*, une toxine de type RTX, HlyA, est sécrétée par un système de sécrétion de type I impliquant notamment les protéines HlyB et HlyD (Koronakis *et al.*, 1992). Il est donc probable que les protéines codées par les ORFs 3 et 4, codant respectivement des protéines homologues aux protéines HlyB et HlyD, soient également impliquées dans la sécrétion de la protéine de type RTX codée par l'ORF 5. En général, les gènes permettant la production et la sécrétion des toxines de type RTX sont disposés sous forme d'un opéron *hlyC-A-B-D*, ce qui semble être le cas pour les ORFs 3, 4 et 5 d'après les données du logiciel SoftBerry (<http://www.softberry.com>). Cependant, nous n'avons pas identifié d'ORF codant une protéine de type HlyC, protéine impliquée dans l'activation des protéines RTX via des modifications post-transcriptionnelles (Ludwig *et al.*, 1996).

Entre ces ORFs potentiellement impliqués dans la production de toxine de type RTX et le gène *alpR*, sont positionnés dans des directions opposées les ORF 7 et 8 codant des protéines homologues à des régulateurs transcriptionnels ayant été identifiés chez des bactériophages. La protéine codée par l'ORF 7 possède des homologies avec les protéines phagiques de type Ogr (Interpro IPR 007684) ; la protéine Ogr est impliquée dans la transcription tardive des gènes du bactériophage P2 d'*E. coli* (Slettan *et al.*, 1992). La protéine codée par l'ORF 8 présente des homologies avec les régulateurs de transcription de type Ner présents chez différents phages d'entérobactéries.

A

M	T	S	T	V	T	T	D	G	D	D	L	L	T	G	D	W	R	18
A	D	T	L	R	G	G	A	G	N	D	T	L	L	G	N	D	G	36
D	D	V	L	E	G	G	D	G	D	D	R	L	D	G	G	T	G	54
A	N	S	L	F	G	G	A	G	N	D	T	L	I	G	G	S	V	72
N	D	S	L	D	G	G	A	G	D	D	V	I	S	G	G	T	G	90
N	D	L	I	S	G	G	D	G	A	D	S	I	D	G	G	E	N	108
D	D	S	I	D	G	G	A	G	D	D	T	I	L	G	G	G	G	126
R	D	V	V	M	A	G	D	G	D	D	L	V	R	D	G	D	T	144
V	W	S	D	D	R	F	D	G	G	A	G	N	D	T	L	D	G	162
G	F	G	S	D	T	L	I	G	G	A	G	N	D	R	L	A	V	180
G	N	D	Y	N	G	D	V	L	D	G	G	D	G	D	D	T	L	198
I	G	G	M	G	A	D	R	L	A	D	G	A	G	A	D	L	V	216
Q	A	G	G	G	D	D	Q	L	D	H	V	L	S	D	Q	A	G	234
A	D	T	L	D	G	G	A	G	Y	D	R	L	R	V	A	L	S	252
A	G	Q	V	T	A	A	V	A	A	D	L	V	A	L	A	D	F	270
I	Q	R	H	G	D	D	G	Q	S	F	S	G	Q	A	I	R	L	288
A	A	N	N	W	N	A	L	E	V	T	V	D	G	R	T	V	A	306
V	G	D	L	A	G	L	V	V	A	A	P	N	R	A	P	V	V	324
G	D	Q	S	L	T	G	T	E	D	T	P	L	A	G	T	V	G	342
A	S	D	P	D	G	D	A	L	S	Y	G	I	G	A	G	P	A	360
H	G	R	L	V	L	G	D	D	G	R	F	T	Y	M	P	D	A	378
D	Y	A	G	G	D	S	F	R	I	D	V	A	D	G	R	G	G	396
V	S	S	Q	T	V	T	V	A	L	A	A	V	N	D	A	P	G	414
A	A	V	L	D	G	A	A	V	A	E	H	A	A	A	G	T	V	432
V	G	T	A	Q	A	R	D	P	D	G	D	A	L	A	Y	S	L	450
T	D	D	A	G	G	R	F	V	I	D	A	A	S	G	V	L	S	468
V	A	A	G	A	D	L	D	Y	L	R	A	P	V	H	A	V	T	486
V	R	V	T	D	A	A	G	M	S	A	D	K	V	F	H	I	G	504
V	T	A	A	R	D	D	G	A	A	D	A	E	G	L	S	P	A	522
E	E	R	A	S	E	A	G	E	A	P	G	G	D	G	R	S	V	540
S	G	D	W	R	A	E	T	L	E	G	G	G	G	D	D	S	L	558
D	S	G	G	G	G	G	T	L	L	G	G	A	G	N	D	R	L	576
T	G	D	W	G	E	D	T	L	R	G	G	S	G	A	D	T	L	594
R	G	G	A	Q	S	D	R	L	Y	G	G	S	G	D	D	V	L	612
E	G	G	S	E	D	D	T	L	D	G	G	T	G	D	D	S	L	630
H	G	G	S	G	A	D	L	L	Y	G	G	M	G	D	D	L	L	648
D	G	G	T	D	A	N	R	L	Y	G	G	S	G	D	D	T	L	666
L	G	G	D	V	G	D	T	L	D	G	G	S	G	D	D	V	I	684
S	G	G	I	G	A	D	S	I	R	G	G	S	G	D	D	R	I	702
D	G	G	E	N	D	D	S	I	D	G	G	S	G	N	D	T	I	720
I	G	G	G	D	R	D	V	V	M	A	G	D	G	D	D	L	V	738
S	D	G	D	D	V	W	S	D	D	R	F	D	G	G	S	G	N	756
D	T	L	D	G	G	L	G	S	D	T	L	I	S	I	P	P	R	774
G	T	S	A	Q	I	*												781

B

Fréquence des acides aminés sur l'ensemble des séquences (en %) :

A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L
11.41	4.62	2.69	17.82	0.00	1.54	2.05	22.44	0.90	3.08	8.59
K	M	F	P	S	T	W	Y	V	*	X
0.13	0.90	1.28	1.67	6.28	5.90	0.77	1.28	6.67	0.00	0.00

Nombre total d'acides aminés = 780

Figure 3.2 : Analyse de l'ORF 5 présentant des homologies avec les gènes codant des protéines de type RTX.

A. Prédiction de la séquence en acides aminés de l'ORF 5. Une séquence répétée de dix acides aminés est indiquée en rouge.

B. Fréquence des acides aminés sur l'ensemble de la séquence de l'ORF 5 (d'après le site http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_stats.html).

Les ORFs 12 à 17, 24 et 25, positionnés en aval du gène *alpI* présentent des homologies avec des gènes de queues de bactériophages ou de prophages de type P2. La région contenant les ORFs 12 à 17 possède la même organisation que les gènes de queues de phage du bactériophage P2 des entérobactéries. En effet, les ORFs 17, 16, 15, 14, 13, 12 sont respectivement homologues aux gènes *gpFI*, *gpFII*, *gpE*, *gpT*, *gpU*, *gpD*, ces gènes étant organisés sous forme d'un opéron situé directement en amont du gène codant le régulateur Ogr chez les bactériophages de type P2 (**Figure 3.1**). Chez ces bactériophages, les différents gènes de cet opéron, dit FETUD, codent pour des protéines de structure ou d'assemblage de la queue des particules phagiques. Les ORF 24 et 25 coderaient également des protéines respectivement homologues aux protéines GpI et GpJ, qui sont impliquées dans la structure des queues de phages. La protéine codée par l'ORF 25 serait notamment impliquée dans la structure de la plaque caudale se situant à l'extrémité des queues de phages. Le positionnement adjacent des ORFs 24 et 25 est également identique à celui des gènes *gpI* et *gpJ* chez le bactériophage P2.

Les séquences protéiques déduites des ORFs 22 et 23 présentent des homologies avec respectivement une protéine associée à la virulence et une protéine hypothétique présentes chez la bactérie *Delftia acidovorans*. Cependant aucun domaine conservé chez la protéine prédite à partir de l'ORF 22 n'a été identifié à l'aide du logiciel INTERPROSCAN. De plus, aucun résultat expérimental n'a permis de démontrer que la protéine de *D. acidovorans*, homologue à celle codée par l'ORF 22, était impliquée dans la virulence. Les fonctions des protéines codées par les ORFs 22 et 23 restent donc indéterminées.

La présence de nombreux ORFs d'origine phagique sur une région d'au moins 15 kb suggère donc l'insertion d'un prophage dans l'environnement proche des gènes *alpR/alpI* impliqués dans le QS chez la souche TVV3. De plus, la présence d'ORFs d'origine phagique à la fois en amont et en aval des gènes *alpR/alpI* pourrait indiquer que les gènes *alpR/alpI* font partie intégrante de ce prophage. Cependant, la seule présence d'ORFs d'origine phagique n'est pas suffisante pour prouver qu'il s'agit d'un prophage fonctionnel.

3.2. Effet de l'inactivation des AHLs sur l'expression d'ORFs adjacents à *alpR/alpI*

Chez de nombreuses bactéries, les gènes régulés par QS sont adjacents aux gènes de type *luxR* et *luxI*, c'est pourquoi nous avons cherché à savoir si l'expression des gènes adjacents à *alpR/alpI* pouvait être régulée par QS. L'expression des ORFs 5, 7, 10 (*alpR*), 11 (*alpI*) et 12 a été analysée par des expériences de RT-PCR semi-quantitative chez la souche *A. lipoferum* TVV3 sauvage, la souche TVV3(pBBR1) et la souche TVV3(pBBR1-*attM*).

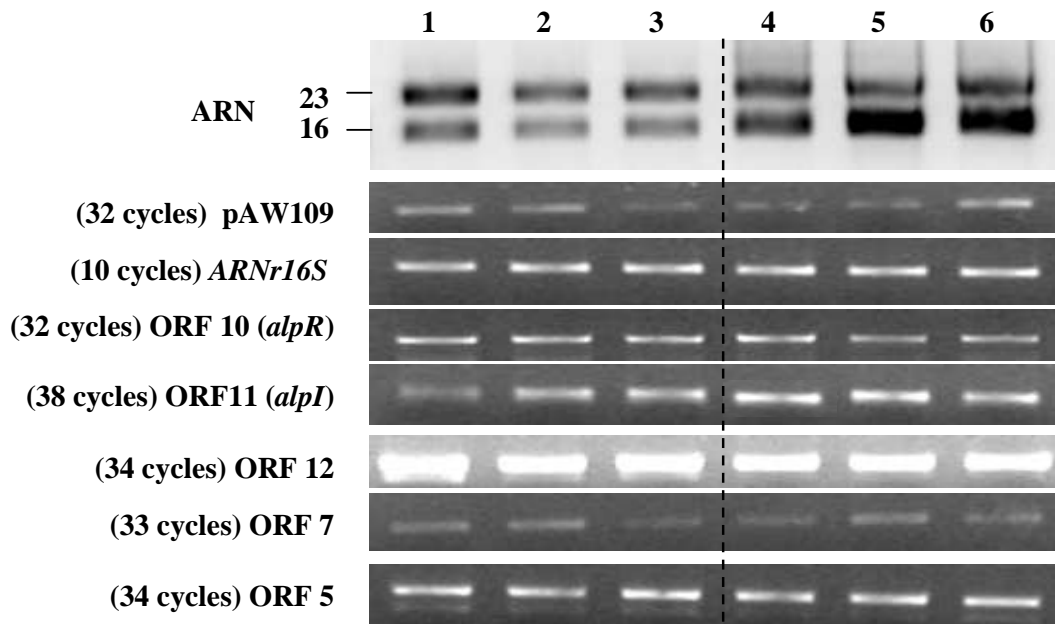


Figure 3.3 : Comparaison de la transcription d'ORFs identifiés sur le cosmide pR1.4 par RT-PCR semi-quantitative entre les souches TVV3, TVV3(pBBR1) et TVV3(pBBR1-attM).

Les bandes correspondant aux transcrits de l'ARNr23S et l'ARNr16S permettent de comparer les rendements d'extraction en ARN totaux entre les souches TVV3 (1, 4), TVV3(pBBR1) (2, 5), TVV3(pBBR1-attM) (3, 6) à partir de cultures arrêtées à DO₅₈₀ de 0.6 (1, 2, 3) et 0.9 (4, 5, 6). Les bandes correspondant aux amplifiats obtenus à partir des ADNc des transcrits de synthèse pAW109 et des ARNr16S sont des témoins positifs des RT-PCR effectuées sur les ARNs des différentes souches. Les RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées à partir des transcrits des ORF 5, ORF 7, ORF 10 (*alpR*), ORF 11 (*alpI*) et ORF 12 identifiées sur la région d'ADN de TVV3 clonée dans le cosmide pR1.4. Les nombres de cycles indiqués représentent les nombres de cycles PCR minima nécessaires pour détecter des bandes visibles sur gel.

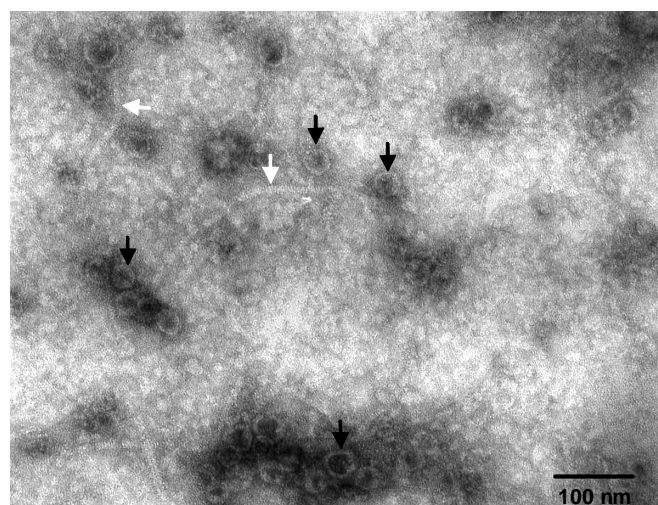


Figure 3.4 : Observations au MET par coloration négative de têtes (flèches noires) et de queues (flèches blanches) de particules phagiques extraites de cultures de TVV3 induites à la mitomycine C.

Plusieurs répétitions de RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN messagers totaux extraits de cultures à DO_{580} de 0,6 et 0,9. Les résultats obtenus ont montré que le niveau d'expression des ORFs 5, 7, 12 était identique dans les trois souches (**Figure 3.3**), indiquant qu'ils ne sont pas soumis à une régulation de type QS bien qu'étant adjacents à *alpR/alpI*. De plus, il n'y aurait apparemment pas d'autorégulation de la transcription des gènes *alpR* et *alpI* par les produits de ces mêmes gènes, ce phénomène d'autorégulation étant retrouvé chez certaines bactéries produisant des AHLs (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio fischeri*). La méthode de RT-PCR semi-quantitative utilisée n'était peut-être pas assez sensible pour mettre en évidence des régulations transcriptionnelles des gènes étudiés. Cependant, elle a permis de mettre en évidence que les ORFs 7 et 12, potentiellement impliqués dans la production de particules phagiques, et que l'ORF 5, pouvant coder une protéine de type RTX, étaient exprimés dans ces conditions de culture.

3.3. Caractérisation d'un bactériophage chez TVV3

Afin de déterminer si les gènes précédemment séquencés étaient partie intégrante d'un prophage entier et fonctionnel, des travaux initiés par L. Vial (Vial, 2005) avaient mis en évidence la formation de particules phagiques à partir de cultures de la souche TVV3 induites à la mitomycine C. Dans la continuité de ces travaux, nous avons réalisé des observations de ces particules phagiques en microscopie électronique à transmission (MET) (**Figure 3.4**). L'ultrastructure des particules phagiques observées a révélé des têtes de phage de forme polyédrique (30 à 35 nm de diamètre) et des queues non contractiles (130 nm de longueur). Cette morphologie est caractéristique de celle des phages appartenant à la famille des *Siphoviridae*. Cependant, les dimensions des têtes phagiques observées dans nos échantillons apparaissent relativement réduites par rapport à celles des phages classiquement présents dans cette famille (diamètre d'environ 60 nm pour les capsides d'après les données de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses*). L'induction à la mitomycine C de cultures des souches TVV3(pBBR1) et TVV3(pBBR1-*attM*) a également entraîné une lyse bactérienne caractéristique de la libération de particules phagiques (résultats non montrés).

Afin de vérifier que les particules phagiques induites par la mitomycine C comportaient les gènes phagiques identifiés dans la séquence du cosmide pR1.4 ainsi que les gènes *alpR/alpI*, un protocole de purification de l'ADN phagique a été mis en place à partir de données de la littérature. Après induction des bactériophages à la mitomycine C, une précipitation des particules phagiques a été réalisée au PEG 8000. Les échantillons ont été traités à la DNaseI afin d'éliminer l'ADN bactérien encore présent. Des PCR ciblant le gène *ARNr16S* (amorces PA et PH, **Tableau 3.1**) et le gène *nifH* (amorces polF et polR) ont été

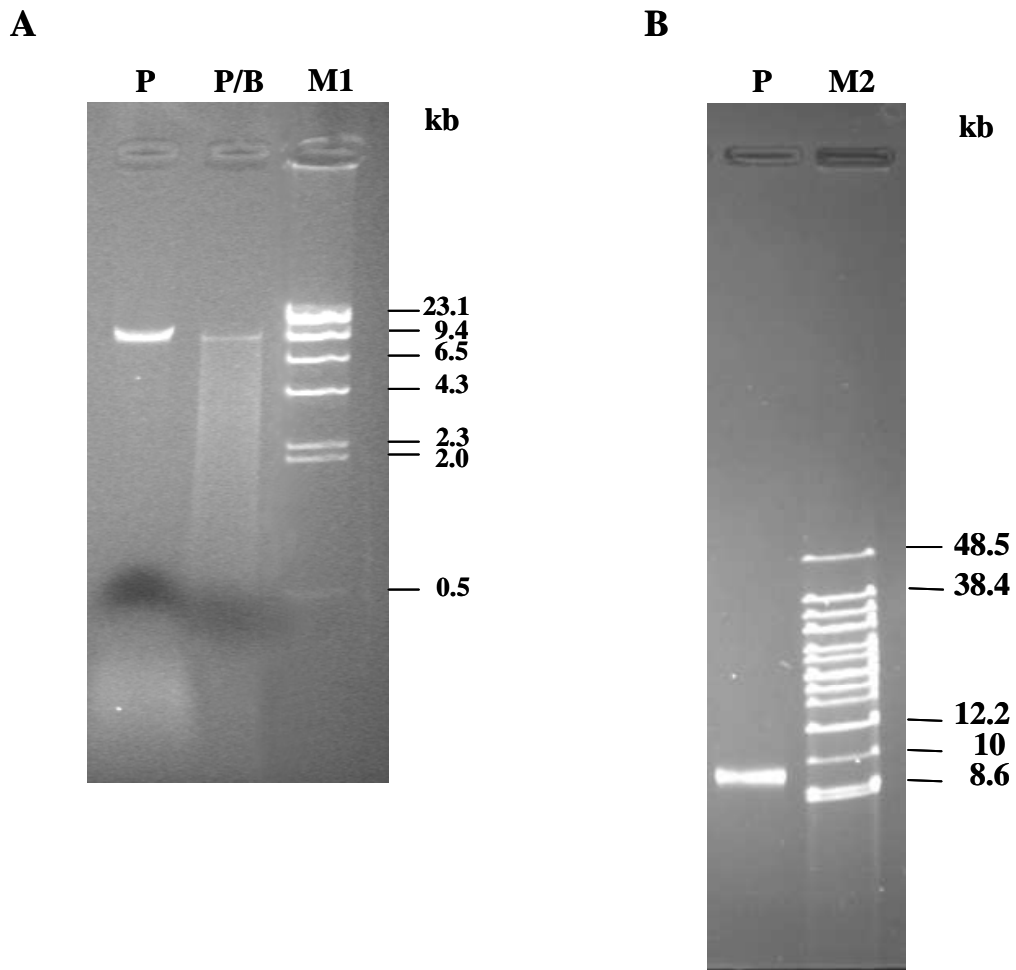


Figure 3.5 : Migration sur gel d'agarose de l'ADN extrait de particules phagiques issues de culture de TVV3 induites à la mitomycine C.

A : Electrophorèse classique en gel d'agarose 0.8%. **B** : Electrophorèse en champ pulsé en gel d'agarose 1%. **P** : ADN natif extrait des particules phagiques. **P/B** : ADN extrait des particules phagiques et digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI. **M1** : marqueur de poids moléculaire λ /*Hind*III (Fermentas). **M2** : marqueur de poids moléculaire λ Mix Marker, 19 (Fermentas).

réalisées afin de vérifier l'absence d'ADN bactérien contaminant ; des amplifications ont toujours été obtenues sur les échantillons d'ADN phagiques pour ces deux gènes. Ces résultats montrent la persistance de traces d'ADN bactérien dans les préparations d'ADN phagique malgré les traitements successifs à la DNaseI. Pour évaluer la taille de l'ADN extrait des particules phagiques, la technique d'électrophorèse en champ pulsé a été utilisée comme alternative à l'électrophorèse classique pour estimer plus précisément la taille de l'ADN encapsidé (≈ 10 kb) (**Figure 3.5A et 3.5B**). L'ADN phagique a également pu être digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI (**Figure 3.5A**), *Bgl*III et *Eco*RV (résultats non montrés), afin de comparer son profil de restriction à celui de la séquence cosmétique. Les digestions de l'ADN phagique réalisées avec ces trois enzymes produisent des fragments d'ADN de taille variable se matérialisant par des « smears » sur gel d'agarose. Cette observation implique donc que les différentes molécules d'ADN d'environ 10 kb, extraites des particules phagiques, sont constituées de séquences nucléotidiques différentes. En effet, il est improbable que la digestion, par ces enzymes de restriction, d'une unique séquence nucléotidique de 10 kb produise une multitude de fragments d'ADN de tailles différentes.

Etant donné que les préparations d'ADN phagiques contenaient toujours des traces d'ADN bactérien, il était inutile de réaliser des amplifications PCR ciblant les gènes *alpR/alpI* ainsi que les gènes phagiques identifiés sur la séquence du cosmide pR1.4 car cela n'aurait pas permis de démontrer la présence de ces gènes au sein des particules phagiques. Le séquençage du génome entier du phage a donc été entrepris (collaboration avec le Génoscope), après clonage de l'ADN phagique dans un vecteur approprié. Cependant, après plusieurs tentatives de clonage et de séquençage, seulement 28 séquences ont été obtenues et n'ont pas pu être assemblées. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces échecs : (i) la quantité limitante d'ADN phagique fournie n'a pas permis d'effectuer un clonage efficace ; (ii) l'ADN phagique cloné pourrait contenir des gènes codant des protéines toxiques pour la souche d'*E. coli* utilisé pour le clonage ; (iii) l'ADN phagique contenait des traces d'ADN bactérien qui ont été préférentiellement clonées ; (iv) l'ADN phagique ne serait pas constitué d'une séquence unique. L'analyse des 28 séquences obtenues a révélé qu'aucune séquence ne comportait de gènes homologues à des gènes phagiques. Cependant, les séquences présentent des homologies avec des gènes identifiés chez des bactéries phylogénétiquement proches d'*Azospirillum*, notamment avec *Magnetospirillum magnetotacticum*, suggérant que l'ADN cloné est bien issu d'*Azospirillum*.

A cette étape, il n'a donc pas été possible de confirmer que les particules phagiques isolées chez la souche *A. lipoferum* TVV3 contenaient les gènes prophagiques identifiés sur le

cosmide pR1.4. Cependant, la formation de particules phagiques, pouvant être induite dans la souche exprimant une lactonase, semble donc indépendante du QS.

4. Discussion

4.1. Caractérisation de l'environnement génétique des gènes *alpR/alpI*

Initialement, les travaux menés sur les QS chez *Azospirillum* avaient permis de caractériser les gènes *alpR* et *alpI*, codant respectivement un régulateur de transcription de type LuxR et une AHL synthase de type LuxI chez *A. lipoferum* TVV3 (Vial *et al.*, 2006a). Le séquençage d'une région comportant les gènes *alpR* et *alpI* avait révélé la présence d'ORF phagiques en amont et en aval de ces gènes (Vial, 2005). Le séquençage complet de la région clonée dans le cosmide pR1.4 a donc permis d'apporter des informations complémentaires sur l'environnement génétique des gènes *alpR/alpI*.

Une région présentant des homologies avec les gènes codant les toxines de type RTX est présente en amont des gènes *alpR/alpI*. Ces toxines sont synthétisées par de nombreuses bactéries Gram négatif et sont des cytolysines formant des pores dans les membranes (Lally *et al.*, 1999). Ces toxines de type RTX sont généralement rencontrées chez des pathogènes où elles ont un rôle important dans la virulence de ces bactéries vis à vis des cellules eucaryotes. Une des toxines de type RTX les plus étudiées est l'hémolysine HlyA d'*E. coli* qui présente une activité cytolytique contre diverses cellules eucaryotes (Stanley *et al.*, 1998). Une toxine de type RTX a également été mise en évidence chez *Rhizobium leguminosarum* et semble impliquée dans la compétitivité pour la nodulation (Oresnik *et al.*, 1999). Un nonapeptide (L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X) caractéristique de ces protéines permet la liaison au calcium et est nécessaire pour l'activité cytolytique (Baumann, 1994). Une région de dix acides aminés (L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X-L/I) est ainsi retrouvée dix-neuf fois dans la protéine déduite de l'ORF 5. Les gènes codant les toxines RTX sont généralement organisés en opéron dit CABD, le gène A codant pour la toxine HlyA, le gène C codant pour une protéine d'activation HlyC, et les gènes B et D codant respectivement les protéines HlyB et HlyD. Les toxines RTX dépourvues de séquence signal sont transportées du cytoplasme à la surface cellulaire par les protéines HlyB et HlyD impliquées dans un système de sécrétion de type I. Les ORFs 3 et 4, homologues respectifs des gènes B et D présents sur la séquence du pR1.4, pourraient donc coder les protéines permettant le transport de la protéine de type RTX codée par l'ORF 5. Cependant, aucun ORF correspondant au gène C n'a été identifié dans cette séquence ; mais un autre gène fonctionnel analogue au gène C pourrait être présent dans une autre région du génome de TVV3. Dans le génome d'*A. lipoferum* 4B (séquençage en cours

d'achèvement au Génoscope), une région contenant les gènes B, D, et A organisés comme sur le pR1.4 a été identifiée ; par contre, le gène C n'a pas été identifié ni à proximité de ces gènes ni autre part dans le génome. Cette situation a également été observée chez *Burkholderia cenocepacia* J2315, mais l'absence de gène homologue au gène C dans le génome de cette bactérie ne semble pas empêcher la production d'une protéine de type RTX active (Whitby *et al.*, 2006). Le fait que les ORFs 2, 4 et 5 semblent organisés en opéron et que l'ORF 5 soit exprimé chez TVV3 (Résultats RT-PCR § 3.2.) suggère la production d'une protéine de type RTX active. Cependant, des études complémentaires devront être réalisées afin de déterminer la fonction de cette toxine et l'identification de cibles potentielles.

Une région présentant des homologies avec des gènes de queues de phages, et notamment avec les gènes de queue du bactériophage P2, a été mise en évidence en aval des gènes *alpR/alpI*. L'organisation dite FETUD rencontrée notamment chez les bactériophages de type P2, le phage VHML de *Vibrio harveyi* et le phage phi-CTX de *Pseudomonas aeruginosa*, a également été identifiée chez *A. lipoferum* TVV3. Toutefois, le gène noté E' (une extension du gène E après un décalage de la traduction en -1) n'a pas été mis en évidence sur la région séquencée (Christie *et al.*, 2002). Deux autres ORFs codant potentiellement des protéines de queue de phage homologues à celles du phage P2 (GpI et GpJ) ont été identifiées à l'extrémité de la séquence du pR1.4, en aval des gènes *alpR/alpI*, ce qui suggère que la région entre l'ORF 12 et 25 fait partie d'un prophage. Le séquençage d'une région située en amont de l'ORF 25 permettrait de déterminer une des bornes de ce prophage putatif dans le génome de TVV3. A l'opposé, deux ORFs codant potentiellement des régulateurs transcriptionnels phagiques sont positionnés en amont des gènes *alp*. La protéine Ogr, potentiellement codée par l'ORF 7, est impliquée dans la transcription tardive des gènes du bactériophage P2 d'*E. coli* alors que la protéine Ner, potentiellement codée par l'ORF 8, est un répresseur transcriptionnel des gènes phagiques précoces chez le phage Mu d'*E. coli* (Kukolj *et al.*, 1989). La protéine Ner serait ainsi impliquée dans la régulation du passage du cycle lysogénique au cycle lytique (Levin & DuBow, 1989). Le gène codant le régulateur Ogr est directement situé en aval du gène D chez le phage P2, ce qui suggère que les ORFs 7 et 8 pourraient également faire partie du même prophage. De plus, l'ORF 7 pourrait constituer une borne du prophage putatif car aucun autre ORF phagique n'a été identifié en aval de celui-ci. Ces hypothèses impliquent donc que les gènes *alpR* et *alpI* feraient aussi partie intégrante de ce prophage. La présence des gènes *alpR/alpI* dans un environnement constitué d'ORFs phagiques suggère que ces gènes aient pu être acquis par la bactérie TVV3 par transfert horizontal de gènes via transduction. Ce phage pourrait faire partie de la famille des *Myoviridae* car l'ensemble des ORFs phagiques identifiés sur la séquence du pR1.4 sont

homologues à des gènes présents dans les génomes de phage de type P2 ou Mu appartenant à la famille des *Myoviridae*.

4.2. Caractérisation d'un bactériophage chez *A. lipoferum* TVV3

Pour vérifier si la région séquencée contenait les gènes d'un prophage fonctionnel chez TVV3, des cultures de cette souche ont été induites avec de la mitomycine C. D'après les observations effectuées en MET, les particules phagiques sont constituées d'une capsid de petite taille (30 à 35 nm) et d'une queue non contractile, ce type de morphologie rappelant celle des phages appartenant à la famille des *Siphoviridae*. Dans de précédentes études, deux phages tempérés avaient été décrits au sein du genre *Azospirillum*. Le premier, nommé Al-1, a été isolé d'un sol brésilien et était capable de former des plages de lyse sur la souche *A. lipoferum* Br17 (Elmerich *et al.*, 1982). Le second a été caractérisé après induction spontanée ou après induction avec de la mitomycine C à partir de culture de la souche *A. brasilense* Sp7 (Franche & Elmerich, 1981; Germida, 1984). Les observations des phages de Sp7 réalisées en MET avaient également révélé des particules phagiques de morphologie semblable à celle des *Siphoviridae*, mais possédant des capsides de taille plus importante (60 nm) que celles constituant les particules phagiques de TVV3. Les différentes particules phagiques observées en MET à partir de TVV3, bien qu'étant la plupart de temps incomplètes (têtes et queues dissociées), étaient de taille et de morphologie assez similaires entre elles, ce qui suggère qu'un seul type de phage serait induit dans les conditions testées.

Pour compléter la caractérisation du phage induit chez TVV3, la purification de l'ADN présent dans les particules phagiques a été entreprise, et a révélé la présence de molécules d'ADN dont la taille a été estimée à 10 kb sur PFGE. Cette taille est nettement inférieure à celle de l'ADN des phages de type P2 (33593 pb pour le phage P2 d'*E. coli* et 35580 pb pour le phage phi-CTX de *Pseudomonas aeruginosa*). Le prophage présent dans la région séquencée du cosmide pR1.4 présentent les caractéristiques d'un prophage de type P2 ; il est donc peu probable que les particules phagiques observées chez TVV3 résultent de l'induction de ce prophage. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'au moins deux prophages présentant des caractéristiques différentes dans le génome de la souche TVV3. La présence de plusieurs prophages au sein d'une même souche a déjà été montrée chez d'autres bactéries, ainsi 18 régions contenant des prophages entiers ou des vestiges de prophages ont été identifiées au sein du génome de la bactérie pathogène *E. coli* O157 Sakai (Ohnishi *et al.*, 2001). Pour montrer si plusieurs prophages peuvent être fonctionnels chez TVV3, d'autres agents inducteurs, tels que les UV ou le peroxyde d'hydrogène, pourraient être utilisés pour compléter cette étude.

La taille de l'ADN encapsidé dans les particules phagiques de TVV3 est assez inhabituelle pour un phage de type *Siphoviridae*. En effet, les tailles des génomes des phages de cette famille se situent entre 18 kb et 500 kb (Casjens, 2005), la taille du plus petit génome séquencé de *Siphoviridae* disponible dans NCBI étant de 14510 pb (phage de *Lactococcus* bIL311, numéro d'accèsion GenBank AF323672). Les digestions de l'ADN phagique purifié par différentes enzymes de restriction ont toutes produit un « smear » de digestion d'ADN sur gel ; de plus, les essais de séquençage de l'ADN phagique n'ont pas pu aboutir car les séquences obtenues n'ont pas pu être assemblées. Ces différentes observations suggèrent que le phage mis en évidence chez TVV3 pourrait être un phage particulier de type GTA (*Gene Transfer Agent*). Comparativement à des prophages fonctionnels classiques, les GTA décrits jusqu'à maintenant possèdent certaines particularités : (i) les particules phagiques formées sont en effet de petite taille (de 30 à 45 nm pour la capside, de 7 à 64 nm pour la queue) ; (ii) la taille de l'ADN encapsidé ne peut donc qu'être réduite (de 4,4 à 13,6 kb) ; (iii) enfin, contrairement à des prophages fonctionnels, la majorité de particules de GTA produites contient des fragments aléatoires d'ADN génomique de l'hôte alors qu'une minorité contient des portions du génome du GTA, ce qui leur permet ainsi d'être responsables de transductions généralisées (Stanton, 2007). Cette hypothèse expliquerait que les PCR ciblant les gènes *nifH* et l'*ARNr16S* réalisées sur l'ADN extrait des particules phagiques de TVV3 soient toujours positives. Des analyses bioinformatiques ont montré que les GTA seraient largement distribués au sein des alpha-proteobacteries, en particulier chez les bactéries appartenant à la famille des *Rhodobacteraceae* (Lang & Beatty, 2007). Chez *Rhodobacter capsulatus*, il existe notamment un lien entre QS et GTA, car la synthèse d'AHLs chez cette bactérie régule positivement la production de GTA (Schaefer *et al.*, 2002). Cependant, la production d'AHLs chez *A. lipoferum* TVV3 ne semble *a priori* pas impliquée dans la production de particules phagique dans nos conditions testées, puisque cette dernière requiert l'ajout de mitomycine C. Des expériences complémentaires, impliquant par exemple des essais de transduction, pourraient permettre de valider l'hypothèse de la présence d'un GTA chez *A. lipoferum* TVV3.

4.3. La présence des gènes *alpR/alpI* dans le génome de TVV3 résulte-t-elle d'un transfert horizontal de gènes via un bactériophage ?

Plusieurs résultats avaient permis de proposer l'hypothèse que les gènes *alpR/alpI* aient pu être acquis par transfert horizontal de gènes (Vial *et al.*, 2006a). En effet, ces gènes ont été identifiés uniquement chez la souche TVV3 et sont localisés sur un plasmide présent uniquement chez cette souche ; de plus, la région de 2600 pb contenant les gènes *alpR/alpI*,

avait révélé un pourcentage GC (59.3%) contrastant avec celui classiquement observé chez *Azospirillum* (69-70%) (Vial *et al.*, 2006a). Plusieurs études de phylogénie ont montré que certains gènes de type *luxR/luxI* ont pu être acquis par transfert horizontal de gène (Boucher *et al.*, 2003; Gray & Garey, 2001). Dans notre étude, la présence des gènes *alpR/alpI* dans une région contenant des ORFs phagiques pourrait étayer cette hypothèse. Le pourcentage GC de la région contenant les ORFs phagiques (ORF 7 à ORF 25) est de 64.77% alors que le pourcentage GC de la portion de séquence en amont (ORF 1 à ORF 6), qui est de 68.98%, est plus proche de celui observé chez *Azospirillum*. Une modification du pourcentage en GC dans une région d'un génome peut indiquer un événement de transfert horizontal de gènes. Les gènes *alp* pourraient donc avoir été acquis par transfert horizontal de gène via un bactériophage intégratif.

4.4. Rôle du QS chez *A. lipoferum* TVV3 ?

Chez de nombreuses bactéries, les gènes régulés par QS sont situés dans l'environnement génétique des gènes de type *luxR/luxI*. Ainsi, chez *Vibrio fischeri*, le premier exemple décrit de QS, les gènes *luxR* et *luxI*, permettant de contrôler la production de bioluminescence, sont situés en amont de l'opéron *luxCDABEG*. Chez *Pseudomonas aureofaciens*, les gènes *phzR* et *phzI* contrôlent la production de phénazine, dont les gènes de biosynthèse sont situés à proximité des gènes *phzR* et *phzI* (Pierson *et al.*, 1994). De plus, le QS peut être impliqué dans la régulation du transfert horizontal de gène, comme dans le cas des GTA de *R. capsulatus*, et également dans la mobilité d'élément génétique mobile, tels que le transposon TnTIR de *Serratia marcescens* (Schaefer *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2006). Cependant chez *A. lipoferum* TVV3, les résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative sur les transcrits de certains ORFs phagiques adjacents aux gènes *alpR/alpI*, n'ont pas montré de différence de niveau d'expression entre la souche TVV3 sauvage et la souche exprimant une lactonase, indiquant qu'ils ne sont pas soumis à une régulation de type QS. L'utilisation d'une méthode plus résolutive telle que la RT-PCR quantitative, en ciblant à nouveau les ORFs testés et aussi d'autres ORFs phagiques pourrait permettre de confirmer l'absence d'implication du QS dans la régulation de l'expression des ORFs phagiques. De plus, l'ajout de mitomycine C dans des cultures de la souche TVV3 sauvage et de la souche exprimant une lactonase provoque une lyse bactérienne similaire chez les deux souches, ce qui suggère que l'induction du prophage serait indépendante du QS chez TVV3.

Toutefois, il existe de nombreux exemples où les gènes régulés ne sont pas localisés à proximité des gènes de type *luxR/luxI* et les gènes régulés peuvent être disséminés sur l'ensemble du génome. Ainsi, une analyse du transcriptome chez *Pseudomonas aeruginosa* a

mis en évidence que 6 % des gènes étaient régulés par QS (Schuster *et al.*, 2003). Cependant, les résultats du chapitre 2 nous montrent que l'utilisation d'une approche globale par protéomique et d'une approche ciblant certains phénotypes chez TVV3, n'ont pas permis de mettre en évidence des fonctions régulées par QS chez cette souche. L'acquisition récente des gènes *alpR/alpI* dans le génome de TVV3 pourrait donc impliquer l'absence de régulon QS chez cette souche et ainsi expliquer les résultats obtenus précédemment. En revanche, les AHLs produites par la souche TVV3 pourraient jouer un autre rôle que celui d'autoinducteur. En effet, les oxo-AHLs et leurs produits de dégradation correspondants peuvent agir comme des composés anti-bactériens (Kaufmann *et al.*, 2005) ; dans ce cas, l'acquisition de gènes impliqués dans la synthèse de ce type d'AHLs pourrait conférer un avantage sélectif à la bactérie. La souche TVV3 produisant notamment des 3oxo,C₈-HSL et des 3oxo,C₁₀-HSL (Vial *et al.*, 2006a), des expériences complémentaires seraient donc nécessaires pour tester cette hypothèse.

5. Conclusion

Le séquençage d'une région d'environ 29 kb contenant les gènes *alpR/alpI* a permis de caractériser l'environnement génétique des gènes impliqués dans la production d'AHLs chez *A. lipoferum* TVV3. Neuf ORFs ont pu être détectés sur environ 12 kb en amont des gènes *alp*. En position 5', sont successivement positionnés des ORFs codant potentiellement une protéine de type Lrp, une protéine de chimiotactisme, des protéines de type HlyB et HlyD impliquées dans le transport et la synthèse d'une toxine de type RTX, et une protéine de type HlyA homologue aux toxines de type RTX. Comme c'est le cas chez d'autres bactéries, les ORFs codant les protéines HlyB, HlyD et HlyA seraient organisés en opéron. Les résultats de RT-PCR montrent que l'ORF codant une protéine de type HlyA est exprimé, ce qui suggère que la souche TVV3 pourrait produire une toxine de type RTX active. Cependant, des études complémentaires devront être réalisées afin de déterminer la fonction de cette toxine chez *A. lipoferum* TVV3.

Deux ORFs présents directement en amont des gènes *alp* coderaient respectivement deux régulateurs transcriptionnels phagiques de type Ogr et Ner. En aval des gènes *alp*, 14 ORFs ont été détectés sur une région d'environ 15 kb, 5 ORFs n'ayant pas d'homologues dans les banques de données et 9 ORFs codant potentiellement des protéines de queues de phages. Les gènes *alpR/alpI* sont donc localisés au sein d'une région constituée d'un regroupement d'ORFs phagiques dont les homologies de séquence suggèrent l'existence d'un prophage appartenant à la famille des *Myoviridae*. Les résultats obtenus par RT-PCR semi-

quantitative sur les transcrits de certains ORFs phagiques adjacents aux gènes *alpR/alpI* n'ont pas montré de différence de niveau d'expression entre la souche TVV3 sauvage et la souche exprimant une lactonase, indiquant qu'ils ne sont pas soumis à une régulation de type QS.

Des particules phagiques, dont la morphologie ressemble au phage appartenant à la famille des *Siphoviridae*, ont pu être produites à partir de culture de TVV3 induites à la mitomycine C. La caractérisation moléculaire et morphologique de ce phage laisse supposer qu'il possède les caractéristiques de phages particuliers appelés GTA (*Gene Transert Agent*).

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent donc (i) que l'expression de certains ORFs adjacents aux gènes du QS semble indépendante du QS, (ii) que la présence d'AHLs n'est pas nécessaire à la formation des particules phagiques observées, (iii) que les particules phagiques observées ne résultent pas de l'expression des gènes phagiques identifiés à proximité des gènes *alp*, ce qui impliquerait l'existence d'au moins deux prophages dans le génome de TVV3, dont un serait fonctionnel, (iv) et que les gènes *alpR/alpI* présents dans un environnement génétique constitué d'ORFs phagiques aient pu être acquis par la bactérie TVV3 par transfert horizontal de gènes via transduction.

Chapitre IV :

**Prévalence des bactériophages au sein du
genre *Azospirillum***

Chapitre IV : Prévalence des bactériophages au sein du genre *Azospirillum*

Introduction

Les bactériophages (ou phages) sont des virus n'infectant que les bactéries. Leur statut d'organisme vivant est assez controversé, c'est pourquoi ils sont plus généralement considérés comme des entités biologiques. Les bactériophages sont ubiquistes ; ils sont donc présents dans tous les environnements de la biosphère, mais en quantité particulièrement importante dans les milieux naturels aqueux tels que les océans (Suttle, 2005; Wilhelm & Suttle, 1999). Comme les virus qui infectent les eucaryotes, les phages sont constitués d'une enveloppe protéique externe (appelée capsid) protégeant le matériel génétique (ADN ou ARN). Pour plus de 95 % des phages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin d'une taille de 5 à 670 kb et leur taille varie généralement de 20 à 200 nm (données de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses*) (Ackermann, 2006). Les bactériophages persistent dans le monde bactérien sous deux états distincts : en tant que phage virulent (qui se réplique dans une cellule bactérienne hôte) ou sous forme lysogène (inséré dans le génome sous la forme d'un prophage, il devient partie intégrante du génome de l'hôte). Pour réaliser un cycle lytique (infectieux), les phages, qui sont des parasites obligatoires et ainsi incapables de se reproduire de manière autonome, injectent leur matériel génétique dans la bactérie hôte. Grâce aux enzymes et aux ribosomes produits par la cellule hôte, le phage peut ainsi être répliqué à de nombreux exemplaires avant que la cellule ne soit lysée. Cependant, certains bactériophages ont un comportement différent ; leur matériel génétique peut s'intégrer au chromosome de la bactérie qui le transmet à ses descendants. L'état de prophage correspond à un état de latence du phage, appelée aussi état de lysogénie. Dans certaines conditions (notamment suite à un stress), le prophage peut être induit, engendrant la production de particules phagiques et l'entrée du phage dans un nouveau cycle lytique.

L'augmentation croissante du nombre de génomes séquencés a révélé que les génomes bactériens contenaient de nombreuses régions constituées de prophages entiers ou de vestiges de prophages (Canchaya *et al.*, 2003b; Casjens, 2003). Des analyses bioinformatiques ont notamment permis d'identifier 190 séquences de prophages au sein de 115 génomes bactériens (Canchaya *et al.*, 2004). Les prophages ont été particulièrement mis en évidence et étudiés chez les bactéries pathogènes ou d'intérêt industriel. Des souches de *Vibrio cholerae*, d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines et de *Corynebacterium diphtheriae*

constituent des exemples de bactéries pathogènes, dont les toxines responsables de la virulence sont codées par des gènes de prophages (Canchaya *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2002; Waldor & Mekalanos, 1996). Etant impliqués dans les transferts horizontaux de gènes, les phages peuvent ainsi transférer d'une bactérie à une autre des gènes bactériens impliqués dans la virulence et être responsables de l'émergence de nouvelles souches pathogènes (Brussow *et al.*, 2004). Les études s'intéressant aux rôles des prophages chez des bactéries non pathogènes concernent majoritairement des bactéries d'intérêt industriel telles que les bactéries à Gram positif du genre *Lactobacillus* utilisées dans l'industrie laitière (Brüssow & Desiere, 2001) ; en conséquence, le rôle des prophages chez des bactéries commensales ou symbiotiques reste encore peu étudié.

Les résultats obtenus au chapitre 3 ont permis de mettre en évidence l'existence de prophages chez *A. lipoferum* TVV3. En plus d'avoir mis en évidence l'existence d'un lien potentiel entre QS et prophage chez la souche TVV3, nos travaux ont permis d'initier la caractérisation génétique et morphologique d'un phage chez cette souche. Jusque là, peu de données étaient disponibles concernant l'existence et le rôle des phages chez les bactéries appartenant au genre *Azospirillum*. Au début des années 1980, des travaux avaient montré qu'il était possible d'induire la production de phages chez différentes souches d'*Azospirillum* (Franche & Elmerich, 1981). De plus, Germida (1984) a montré qu'un phage pouvait être induit chez *A. brasilense* Sp7 et CD, dont la morphologie, mais non la taille, était semblable à celle observée pour le phage de TVV3 mis en évidence (Germida, 1984). Cependant, aucune donnée de génomique n'était disponible dans cette étude.

L'étude des phages chez différents modèles bactériens tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Lactococcus lactis* révèle que la présence de prophages chez différentes souches appartenant à la même espèce est relativement fréquente (Chopin *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2007). Les différents résultats préliminaires obtenus sur l'étude des phages chez *Azospirillum* (Franche & Elmerich, 1981; Germida, 1984) (cf. chapitre 3) nous ont donc amené à analyser la prévalence des phages au sein du genre *Azospirillum*. Pour atteindre cet objectif, des inductions à la mitomycine C ont été réalisées sur 24 souches d'*Azospirillum* productrices ou non d'AHLs. Selon le même procédé que pour la souche TVV3, nous avons pu mettre en évidence et purifier l'ADN phagique pour cinq autres souches d'*A. lipoferum* (4B, 4V₁, 4T, B510, B518), quatre souches d'*A. brasilense* (Sp245, Sp7, Cd et Wb1) et une souche d'*A. doebereineriae* (GSF71). La migration en électrophorèse en champ pulsé montre une corrélation entre la taille des génomes phagiques et l'espèce : la taille des génomes phagiques se situe autour de 10 kb pour les phages issus de l'espèce *lipoferum* et entre 62-65 kb pour ceux de l'espèce

brasiliense. De plus, le génome du phage isolé de la souche Cd a été séquencé (en collaboration avec le Génoscope), et constitue le premier génome séquencé d'un bactériophage isolé d'une souche d'*Azospirillum*. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans la revue Applied and Environmental Microbiology (2008, Volume 74, Numéro 3, pages 861-874).

Bacteriophage prevalence in *Azospirillum* and analysis of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage

Mickaël BOYER¹, Jacqueline HAURAT¹, Sylvie SAMAIN², Béatrice SEGURENS², Frédérick GAVORY², Víctor GONZÁLEZ³, Patrick MAVINGUI¹, René ROHR¹, René BALLY¹ and Florence WISNIEWSKI-DYÉ^{1*}.

¹Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France; IFR 41, Villeurbanne, F-69622, France.

²Génomscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux CP 5706, 91057 Evry cedex, France.

³Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP565-A Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

Running title: Bacteriophages of *Azospirillum*

Journal: Applied Environmental Microbiology

Section: Genetics and Molecular Biology

Keywords: *Azospirillum*, bacteriophage, *Siphoviridae*, PFGE, PGPR

*Corresponding author. Mailing address: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France. Phone: +33 4 72 44 58 89. Fax: +33 4 72 43 12 23. E-mail: wisniews@biomserv.univ-lyon1.fr

Abstract

The prevalence of bacteriophages was investigated in 24 strains of four species of plant growth-promoting rhizobacteria belonging to the genus *Azospirillum*. Upon induction by mitomycin C, the release of phages particles was observed in eleven strains from three species. Transmission electron microscopy revealed two distinct sizes of particles, depending on *Azospirillum* species, typical of the *Siphoviridae* family. Pulsed-field gel electrophoresis and hybridization experiments carried out on phage-encapsidated DNAs revealed that all phages isolated from *A. lipoferum* and *A. doebereineriae* strains had a size of about 10 kb whereas all phages isolated from *A. brasilense* strains displayed genome sizes ranging from 62 to 65 kb. Strong DNA hybridizing signals were shown between most phages hosted by the same species whereas no homology was found between phages harbored by different species. Moreover, the complete sequence of *A. brasilense* Cd bacteriophage (Φ Ab-Cd) genome was determined as a double stranded DNA circular molecule of 62,337 pb that encodes 95 predicted proteins. Only 14 could be assigned functions, some of which being involved in DNA processing, phage morphogenesis, and bacterial lysis. In addition, Φ Ab-Cd complete genome was mapped as a prophage on a 570-kb replicon of strain *A. brasilense* Cd, and a region of 27.3 kb of Φ Ab-Cd was found to be duplicated on the 130-kb pRhico plasmid previously sequenced from *A. brasilense* Sp7, the parental strain of *A. brasilense* Cd.

Introduction

Bacteriophages are likely to be numerically the most prominent biological systems on earth, with an estimated population size of $\geq 10^{30}$ phage particles (Suttle, 2005). Bacteriophages are ubiquitous in nature, and it has been suggested that they are environmentally important both in controlling the number of bacteria and in facilitating gene transfer. Indeed, bacteriophages represent one of the three major mobile genetic elements that contribute significantly to horizontal gene transfer in bacterial genomes, by transduction. It was calculated that 10^{24} bacteria could be infected per second which implies that a continuous flow of genetic material occurs between bacteria sharing the same environments (Tettelin *et al.*, 2005). Seventy percent of bacterial complete genomes investigated contain prophage sequences of >10 kb (Canchaya *et al.*, 2003b), and it is believed that well over 50% of bacteria isolated from various environments contain prophages or are lysogenized. The integrated viral DNA, referred to as a prophage, can harbour genes contributing to increase the fitness of bacterial cells, such as phage-encoded virulence factors of some pathogenic bacteria (Canchaya *et al.*, 2004). Consequently, the majority of the data concerning prophages comes from gram-positive bacteria and γ -proteobacteria of medical and industrial interest (Canchaya *et al.*, 2003b), but very little information is available concerning phage isolated from commensal or symbiotic bacteria.

Plant beneficial bacteria, including some strains belonging to the genus *Azospirillum*, are usually referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Azospirillum* is a group of free-living α -proteobacteria whose plant growth promotion of cereals and grasses leads to an increase of crop yield by up to 30%. The actual benefit from biological nitrogen fixation has been questioned, and plant growth promotion by *Azospirillum* seems to be due mainly to production of phytohormones (Bashan *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2001). The most abundant phytohormone produced is indole-3-acetic acid, allowing an increase in the number of lateral roots and root hairs; this results in a higher absorption of water and minerals from the soil (Bashan *et al.*, 2004). Although many studies on *Azospirillum* are related to bacterial physiology and ecology, few genomics data are available. It has been shown that the genomes of *Azospirillum* strains differ in size (from 4.8 to 9.7 Mb) and in architecture, one of the main features being the presence of numerous plasmids (Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Martin-Didonet *et al.*, 2000). Some plasmids were shown to be involved in major genomic rearrangements occurring during phenotypic switch, indicating that genomes of *Azospirillum* are highly dynamic (Vial *et al.*, 2006b). To date, only two temperate phages were described in this genus. The first one, termed AI-1, has been isolated from a Brazilian soil and is able to

Table 4.1: *Azospirillum* strains used in this study.

Strains	Relevant properties	Source or Reference	Lysis with mitomycin C	Estimated size of the encapsidated DNA (kb)
<i>A. brasilense</i>				
Aba2	Strain isolated from soil (Senegal)	Laboratory collection	–	
Cd	Strain isolated from <i>Cynodon dactylon</i> (USA)	(Eskew <i>et al.</i> , 1977)	+	62
L4	Strain isolated from sorgho (Mali)	(Kabir <i>et al.</i> , 1995)	–	
NC16	Strain isolated from soil (Mali)	Laboratory collection	+	ND
NC20	Strain isolated from soil (Mali)	Laboratory collection	–	
R5(15)	Strain isolated from rice (Cuba)	Laboratory collection	–	
Sp7	Strain isolated from <i>Digitaria decumbens</i> (Brazil)	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)	+	62
Sp245	Strain isolated from wheat (Brazil)	(Baldani <i>et al.</i> , 1986)	+	65
Wb1	Strain isolated from wheat (Pakistan)	Laboratory collection	+	62
Wb3	Strain isolated from wheat (Pakistan)	Laboratory collection	+	ND
Wn1	Strain isolated from irrigated wheat (Pakistan)	Laboratory collection	–	
<i>A. doebereineræ</i> GSF71	Strain isolated from <i>Miscanthus sinensis</i> (Germany)	(Eckert <i>et al.</i> , 2001)	+	10
<i>A. irakense</i> KBC1	Strain isolated from rice (Iraq)	(Khammas <i>et al.</i> , 1989)	–	
<i>A. lipoferum</i>				
4B	Strain isolated from rice rhizosphere (France)	(Bally <i>et al.</i> , 1983)	+	10
4T	Strain isolated from rice rhizosphere (France)	(Bally <i>et al.</i> , 1983)	+	10
4V ₁	Phase variant of 4B	(Alexandre <i>et al.</i> , 1999)	+	10
B518	Strain isolated from rice (Japan)	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001)	+	10
B510	Strain isolated from rice (Japan)	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001)	+	10
Br17	Strain isolated from maize (Brazil)	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)	–	
CRT1	Strain isolated from corn (France)	(Jacoud <i>et al.</i> , 1999)	–	
MRB16	Strain isolated from rice (Bangladesh)	Laboratory collection	–	
NC4	Strain isolated from soil (Mali)	(Kabir <i>et al.</i> , 1995)	–	
RSWT1	Strain isolated from rice (Pakistan)	Laboratory collection	–	
TVV3	Strain isolated from rice (Vietnam)	(Trần Vân <i>et al.</i> , 1997)	+	10

ND: no phage DNA could be purified

form plaques on *A. lipoferum* Br17 (Elmerich *et al.*, 1982). The second one has been characterized after spontaneous or mitomycin C induction in *A. brasilense* Sp7 culture (Franche & Elmerich, 1981; Germida, 1984).

In the frame of investigating the role of phages in the biology of *Azospirillum*, we first studied their prevalence by the ability of 24 *Azospirillum* strains from four species to release phage particles after mitomycin C treatment. Phage particles were isolated and morphological studies were performed by transmission electron microscopy (TEM). Phage DNA was then purified and the molecular relatedness of phages was investigated by Southern hybridization experiments. Finally, the complete genome sequence of the lytic phage Φ Ab-Cd from *A. brasilense* Cd strain was obtained and analyzed.

Materials and Methods

Media and bacterial growth conditions.

The *Azospirillum* strains used in this study are presented in **Table 4.1**. *Azospirillum* strains were grown at 28°C in modified Luria-Bertani (LBm, containing only 5 g liter⁻¹ of NaCl) or in nitrogen-free basal supplemented with 0.025% LBm (Nfbm) (Nelson & Knowles, 1978). *Rhizobium etli* CFN42 was grown in tryptone-yeast extract (TY) medium supplemented with 6 mM CaCl₂ (Beringer). For cloning purposes, *Escherichia coli* strains containing recombinant plasmids were grown in 2YT broth or agar at 37°C with chloramphenicol at 100 µg ml⁻¹ (Sambrook *et al.*, 1989).

Induction and purification of phage particles.

For kinetics analysis of bacterial lysis, *Azospirillum* strains were grown in 100 ml LBm until the OD₅₈₀ reached 0.3. The cultures were then split equally into two flasks (50 ml in each), with one receiving mitomycin C (final concentration, 0.1 µg ml⁻¹) and the other serving as control. Incubation of both flasks was continued and growth was monitored by measuring OD₅₈₀ of subsamples every hour. For subsequent studies, incubation was carried during 16 hours after the addition of mitomycin C. Purification of phage particles from all strains was carried out by clearing the induced bacterial lysate (25 ml or 50 ml) by centrifuging two times at 5000 × g for 10 min at 20°C. The supernatant was treated with 100 µg of DNase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) for 1 h at 37 °C to digest DNA of the bacterial host. NaCl was next added to a final concentration of 1 M and the culture supernatant was stirred until complete dissolution of the salt, and centrifuged at 5000 × g for 10 min at 20°C. The supernatant was transferred to a new tube and 10 % (wt/vol) of PEG

8000 (Fluka, Buchs, Switzerland) was added. The suspension was then agitated for 2 hours at 28°C and the precipitated phages were pelleted by centrifugation at $5000 \times g$ for 20 min at 20°C, and finally resuspended in 2×0.5 ml of suspension buffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5]). All nucleic acids present in the suspension outside phage particles were eliminated by incubating successively: (i) 30 min at 37°C with a mixture of DNase I and RNase (final concentration, 600 µg ml⁻¹ each) (Euromedex, Mundolsheim, France), (ii) 30 min with DNase I (final concentration, 600 µg ml⁻¹), and (iii) 1 hour with DNase I (final concentration, 1.2 mg ml⁻¹). To isolate phage DNA, purified phages particles were first treated 15 min at 65 °C in a lysis solution containing 10 µl of proteinase K (20 mg ml⁻¹, Fermentas, Mundolsheim, France), 65 µl of EDTA 0.25 M, and 20 µl of SDS 10% . Phage DNA was finally extracted using phenol and chloroform procedure (Sambrook *et al.*, 1989), and the DNA pellet was dissolved in 35 µl of ultra-pure water per 25 ml of starting culture.

Transmission electron microscopy (TEM).

The production of phage particles in *Azospirillum* cultures was induced as described above. Then bacterial lysate (12 ml) was cleared by two centrifugations at $5000 \times g$ for 10 min at 20°C, and a filtration through a 0.45-µm-pore-size-filter (type CA, Millipore, Billerica, MA, USA). The phage suspension was then transferred into a polyallomer centrifuge tube (14 × 89 mm) (Beckman Coulter, Roissy, France) and centrifugated at 4 °C for 5 hours at $75,000 \times g$. The phage pellet was resuspended in 30 µl of suspension buffer without pipetting. A drop of phage suspension was applied to a 300 mesh carbon/formvar coated grid. The sample was stained either with aqueous 1% phosphotungstic acid or 2% uranyl acetate for 30 sec. Excess stain was removed with a filter paper and the grids allowed to air-dry prior examination using a Philips CM 120 transmission electron microscope under 100 kV.

PFGE of phage DNA and hybridization experiments.

Phage DNA was extracted from purified particles as above. A total of 100 ng undigested DNA was deposited per well of 1% agarose gel (Pulsed-field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories) in $0.5 \times$ TBE buffer (Euromedex, Mundolsheim, France).. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was run using a Chef-DRIII System (Bio-Rad Laboratories) with the following parameters: $0.5 \times$ TBE running buffer at 14°C, 1 s initial switch time, 6 s final switch time, 6 V cm⁻¹, 15 h run time, and 14 °C buffer temperature. The gels were stained with ethidium bromide and visualized using Gel-doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). For Southern blot experiments, phage DNA were transferred to GeneScreen Plus

nylon filters (PerkinElmer, Zaventem, Belgium). Phage DNA randomly labeled with [α - 32 P]dCTP using the *Redi-prime* DNA labelling system (Amersham plc, Little Chalfont, England) was used as a probe. Southern blotting, and hybridization were carried out according to established protocols (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA sequencing and bioinformatics analyses.

The DNA template used for sequencing the *A. brasilense* Cd phage was purified from phage particles as described above. The template was subjected to mechanical shearing and cloned as fragments of 10 kb into the low-copy pCNS home vector (pSU18 modified) (Bartolomé *et al.*, 1991). Plasmid DNAs were purified and end-sequenced using dye-terminator chemistry on ABI3730xl DNA Analyzer sequencers. 1500 sequences were generated from both ends of the clones. The Phred/Phrap/Consed software package (www.phrap.com) was used for sequence assembly and quality assessment (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Open reading frame (ORFs) in the final genome sequences were predicted using Glimmer 2.0 software (Delcher *et al.*, 1999) and annotated with ARTEMIS 8 (Rutherford *et al.*, 2000). In our analyses, putative ORFs contained either AUG (methionine), UUG (leucine), or GUG (valine) as the starting codon. The predicted proteins were compared against the NCBI protein databases by using BLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1997). Searches for putative conserved domains of identified proteins were done using the INTERPROSCAN and CD-Search program (Marchler-Bauer *et al.*, 2005; Zdobnov & Apweiler, 2001). The accession number for the phage DNA sequence obtained in this study is CU468217.

Phylogenetic analysis of functional genes.

The translated amino acid sequences of putative genes encoding terminase (ORF29), phage major capsid protein (ORF33), lysozyme (ORF53), and integrase (ORF72) were used to construct phylogenetic trees. The BLAST program was used to identify homologous sequences to these ORFs in the draft of *A. brasilense* Sp245 genome (available at <http://genomics.ornl.gov/research/azo>). These amino acid sequences were aligned with sequences of viruses found in the GenBank database, using the program CLUSTAL W, and phylogenetic analyses were conducted using MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A Blosum 30 matrix was calculated with a gap penalty of 10.0. Distance trees were constructed with the neighbor-joining algorithm and the bootstrap method was employed with 1,000 replicates to estimate the robustness of the tree topologies.

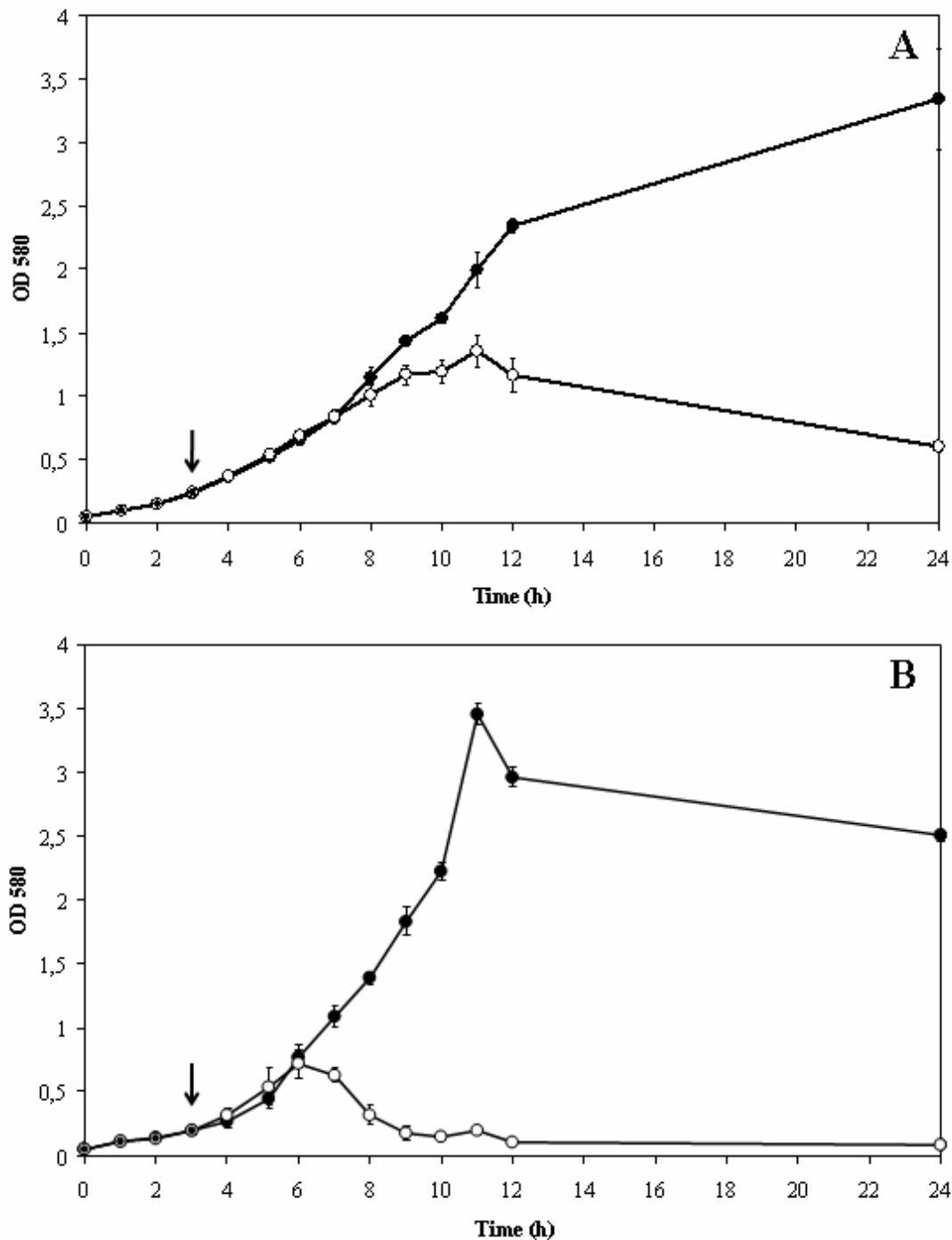


Figure 4.1: Effect of mitomycin C treatment on growth of *Azospirillum*.

(A) *A. brasilense* strain Cd and (B) *A. lipoferum* strain B518. Cell growth was followed by measuring the optical densities at 580 nm in a culture treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C (open circles) and in a control culture without treatment (full circles). The addition of mitomycin is indicated by an arrow.

Plasmid content and prophage localization.

Plasmids were separated by a modified Eckhardt agarose gel electrophoresis (Hynes & McGregor, 1990) as applied by Vial and coworkers (Vial *et al.*, 2006b). Plasmid sizes were estimated by comparison with those of *A. brasilense* Sp7 (Caballero-Mellado *et al.*, 1999) and *Rhizobium etli* CFN42 (Romero *et al.*, 1991). Hybridization experiments were carried out on plasmid profiles as previously described (Vial *et al.*, 2006b). For a probe specific to *A. brasilense* Cd phage, several ORFs were first amplified by PCR using template DNA from strain Cd: ORF40 with primers F4908 5'-AGAAGATCAACGCCAGCTTC-3' and F4909 5'-GACTGTGTGCCTGCGTAGAA-3', ORF50 with primers F5561 5'-GCAAACCACAATCACCACAG-3' and F5562 5'-AAGCATCTGGTAACCGTTGG-3', and ORF53 with primers F4906 5'-GGGCTGTATCTGACCGCATA-3' and F4907 5'-CATTGACGGTGGCGTAGAC-3'. The amplification cycle consisted of an initial 5 min at 95 °C, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at annealing temperature, 30 s at 72 °C, followed by a final 7 min extension at 72 °C. Then, ORF50 was chosen, randomly prime labelled as above and used as a probe to hybridize plasmid profiles. For a probe specific to the pRhico plasmid, the *exoC* gene was amplified with primers F5559 5'-CCTTCAGGTCGACGAGATTC-3' and F5560 5'-GGACTACAACGGCATCAAGA-3'.

Results

Induction of temperate phages from different *Azospirillum* strains.

As phage-like elements had been induced previously in cultures of *A. brasilense* Sp7 treated with 0.1 µg ml⁻¹ of mitomycin C (Franche & Elmerich, 1981), a DNA-damaging agent able to activate the RecA-dependent induction of temperate bacteriophages in bacteria, the same procedure was applied in this study. Kinetics of bacterial lysis was monitored with several *A. brasilense* and *A. lipoferum* strains. For *A. brasilense* Cd strain, the growth rate slowed down 6 h after the addition of mitomycin C and a decrease in cell biomass with appearance of cell debris corresponding to bacterial lysis was observed 8h after the beginning of the treatment (**Figure 4.1A**). A similar curve was obtained with *A. brasilense* Sp245 (data not shown). For the *A. lipoferum* strains tested, the growth rate stopped 3h after the addition of mitomycin C and this was immediately followed by a dramatic cell decline, pointing to the release of phage particles (**Figure 4.1B** for *A. lipoferum* B518; data not shown for *A. lipoferum* TVV3 and 4B). For these strains, the eclipse period (time between addition of mitomycin C and release of phage particles) was always shorter and bacterial lysis was more striking and nearly completed 9 h after a contact with mitomycin C. For subsequent analysis of the other *Azospirillum* strains, induction was carried out during 16h before cell lysis was examined.

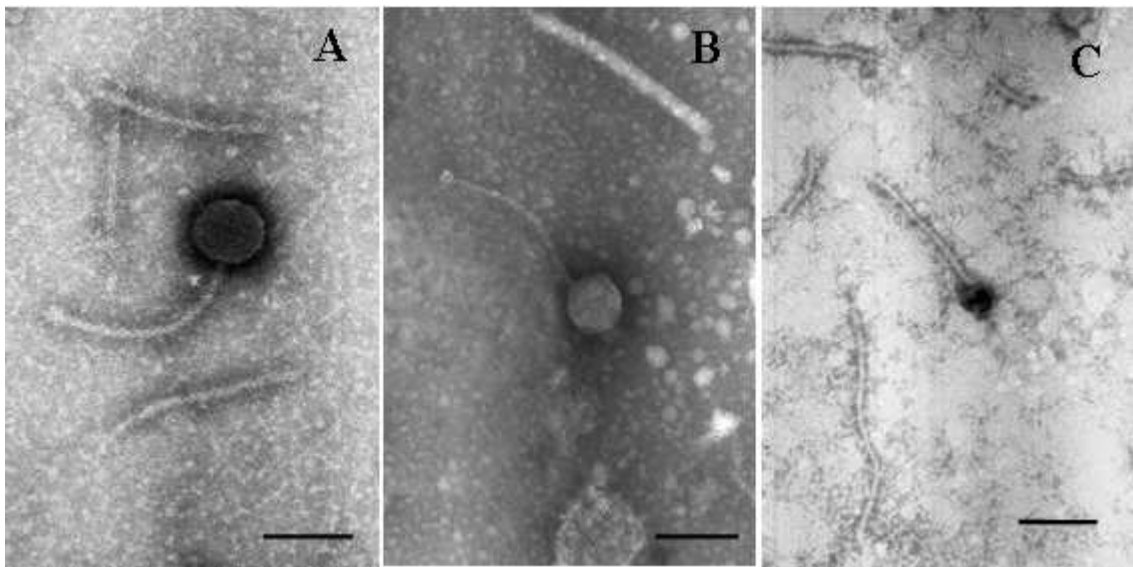


Figure 4.2: TEM micrographs of negatively stained bacteriophages particles of *Azospirillum*.

After addition of $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ mitomycin C, phages particles were observed in the lysates of *A. brasilense* Cd (A), *A. brasilense* Wb1 (B), *A. lipoferum* B518 (C). Bars correspond to 100 nm.

Overall, bacterial lysis was observed for six *A. brasilense* strains (out of eleven), six *A. lipoferum* strains (out of eleven), and for the unique *A. doebereineriae* strain GSF71 tested (**Table 4.1**). As addition of mitomycin C was not accompanied by cell lysis for some strains, including the unique *A. irakense* strain, it demonstrates that cell lysis was not a bias due to the toxicity of mitomycin C. These data indicate that upon triggering SOS response by adding mitomycin C, temperate phages might be induced in some *Azospirillum* strains.

Morphological study of *Azospirillum* bacteriophages.

To ascertain that bacterial lysis was associated with the release of phage particles, the purification of phage-like particles was undertaken from lysates of all strains. TEM analysis was then performed on lysates from two *A. brasilense* and two *A. lipoferum* strains. Phage particles and/or phage parts, (i.e. tail, head, ghost) were detected in the lysates of the four bacterial strains. For all samples, the ultrastructure of phage particles appeared to be similar, displaying long noncontractile tails and polyhedral heads, a morphology that is typical of the *Siphoviridae* family of bacteriophages. Phage particles isolated from the two *A. brasilense* strains, Cd and Wb1, exhibited heads of similar diameter (70 nm for both) and tails of similar size (with an average length of 210 nm) (**Figure 4.2A and 4.2B**). Baseplates could sometimes be observed for those two samples. The observation of entire phage particles isolated from the two *A. lipoferum* strains was more arduous; phage heads had a diameter of 30-35 nm for both isolates, half the size of the heads of phages isolated from *A. brasilense* strains. The tail lengths were estimated at about 190 nm and 130 nm for phage particles isolated respectively from *A. lipoferum* strains B518 (**Figure 4.2C**) and TVV3 (data not shown). Thus, bacterial lysis initially observed in the mitomycin C-treated cultures can be attributed to the release of temperate phages which are putative members of the *Siphoviridae* family. Those bacteriophages were named accordingly to the strain species and name, i.e. Φ Ab-Cd designates the phage isolated from the strain *A. brasilense* Cd, Φ A1-B518 designates the phage isolated from the strain *A. lipoferum* B518, etc.

Relatedness of *Azospirillum* bacteriophages at the genomic level.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been previously used for determining the size of phage genomes (Beilstein & Dreiseikelmann; Schnabel & Jones, 2001). DNA was extracted from all *Azospirillum* phage particles and PFGE analysis confirmed the presence of a DNase-protected extragenomic DNA after mitomycin C induction in all but two *Azospirillum* strains analysed (**Figure 4.3A**). The absence of extragenomic DNA for those two strains indicated that either mitomycin C was able to trigger the SOS response

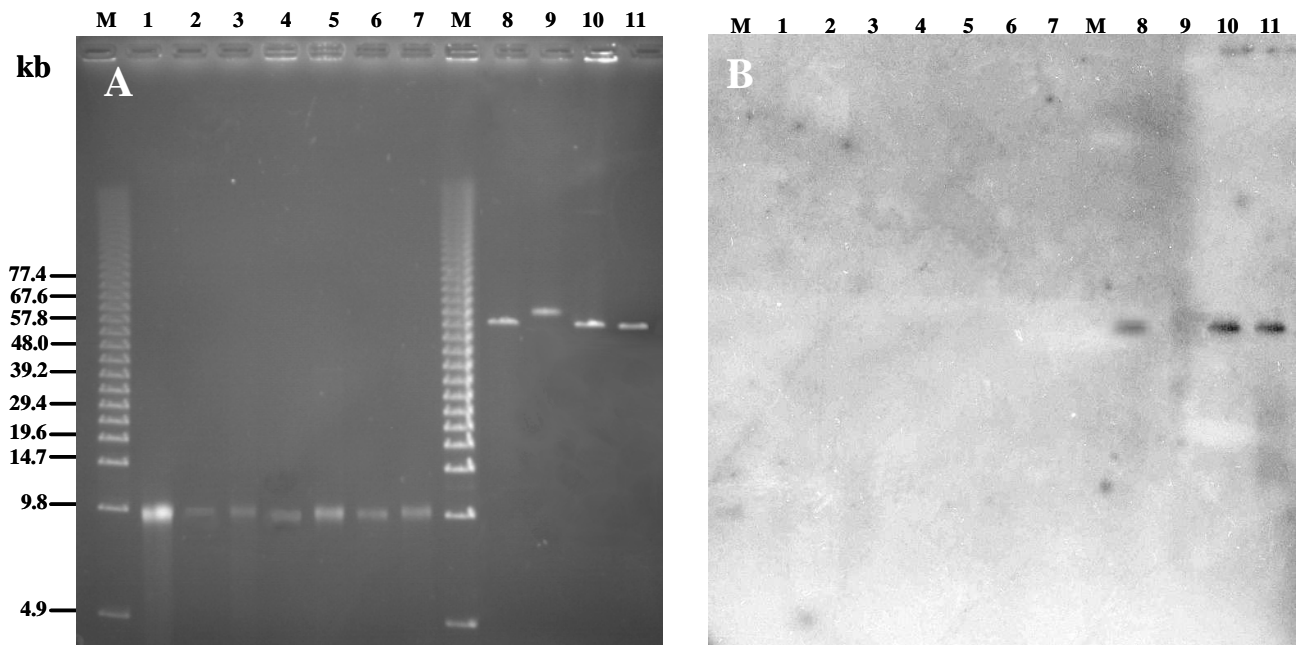


Figure 4.3: PFGE of DNA molecules isolated from phage particles (A) and hybridization experiments (B).

DNA was isolated from the following phage particles: phage isolated from *A. doebereineriae* GSF71, named Φ Ad-GSF71 (lane 1); phages isolated from *A. lipoferum* 4T Φ Al-4T (lane 2), TVV3 Φ Al-TVV3 (lane 3), B510 Φ Al-B510 (lane 4), B518 Φ Al-B518 (lane 5), 4V_I Φ Al-4V_I (lane 6) and 4B Φ Al-4B (lane 7); phages isolated from *A. brasiliense* Wb1 Φ Ab-Wb1 (lane 8), Sp245 Φ Ab-Sp245 (lane 9), Cd Φ Ab-Cd (lane 10) and Sp7 Φ Ab-Sp7 (lane 11). Lanes M, 5 kb ladder DNA size standard. The probe used for the hybridization experiment was the DNA molecule extracted from Φ Ab-Cd (B).

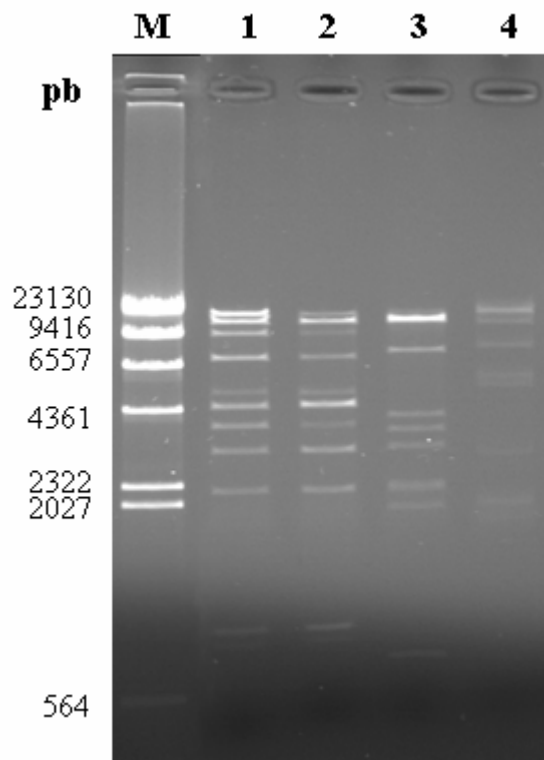


Figure 4.4: Restriction analysis of phage DNAs by restriction analysis.

Lane M: λ DNA digested with *Hind*III. Phage DNA digested with *Eco*RI: Φ Ab-Cd (lane 1), Φ Ab-Sp7 (lane 2), Φ Ab-Sp245 (lane 3), and Φ Ab-Wb1 (lane 4).

independently of the presence of prophages or that the number of particles released was too low to purify DNA. The analysis revealed also that all phages isolated from *A. lipoferum* and *A. doebereineriae* strains showed approximately the same size estimated at about 10 kb (**Figure 4.3A, lanes 1 to 7**). All phages isolated from *A. brasilense* strains displayed bigger genome sizes, with sizes ranging from 62 to 65 kb (**Figure 4.3A, lanes 8 to 11**). From these results, a correlation between the size of phage genomes and the bacterial species hosting the phage could be drawn. Moreover, these observations are consistent with the larger size of phage particles isolated from *A. brasilense* strains, as observed with TEM. To analyze whether the similarities observed above (on the size of phage particles and on the size of phage genomes) were also reflected at the genomic level, hybridization experiments were carried out on all phage DNA molecules separated by PFGE. Using the entire DNA molecule extracted from Φ Ab-Cd as a probe, hybridization signals were clearly obtained exclusively with DNA of phages Φ Ab-Cd, Φ Ab-Sp7 and Φ Ab-Wb1 (**Figure 4.3B, lanes 8, 10 and 11**), suggesting DNA homology between those three phage genomes. When the Φ AI-B518 10 kb-DNA molecule was used as a probe, hybridization signals were observed only with DNA from smaller phages isolated from *A. doebereineriae* and *A. lipoferum* strains (data not shown). In addition, identical restriction patterns were observed for Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp7 (**Figure 4.4**), suggesting a similar architecture for these two phages. This would indeed be consistent with the genetic relatedness of these two *A. brasilense* strains, strain Cd being isolated as a scarlet variant of strain Sp7 after inoculation on plant (Eskew *et al.*, 1977; Tarrand *et al.*, 1978). The restriction pattern of Φ Ab-Wb1 (**Figure 4.4, lane 4**) was unrelated to those of Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp7 despite a strong hybridization signal; this result could be attributed either to the presence of only a few identical genes or genome recombination. The comparison of restriction profiles of *A. lipoferum* and *A. doebereineriae* phage DNAs was not possible as only smears were obtained whatever the endonuclease used (data not shown).

Complete nucleotide sequence of Φ Ab-Cd genome.

As *A. brasilense* Cd is one of the most studied *Azospirillum* strain for its abilities to colonize root-hair zones of different plants and to promote plant growth (Dobbelaere *et al.*, 2001), the complete genome sequence of Φ Ab-Cd was determined using a shotgun strategy, followed by an assembling process with the software phrap and annotation with the software ARTEMIS 8 (Rutherford *et al.*, 2000). Φ Ab-Cd genome is a double stranded DNA circular molecule of 62,337 pb with a G+C content of 63.93%, which is slightly lower than that described for *Azospirillum* (69-71%) (Tarrand *et al.*, 1978). The coding sequence represents 86.35% of the genome, with approximately 1.5 gene per kpb of nucleotide sequence,

Table 4.2: Genome organization of *A. brasiliense* phages ΦAb-Cd

ORF	Start base position	End base position	% GC	No. of aa ^a (kDa)	Identity with pRhico ^b ; GenBank accession no.	Predicted function ^c	INTERPRO family ^d	Most significant database match; GenBank or RefSeq accession no.; % aa identity (E value) ^e
01	43	930	67.57	295 (29.31)	pRhico093; gb AAS83081.1	Unknown		
02	1165	2259	60.82	364 (39.27)	pRhico092; gb AAS83080.1	Unknown		
03	2264	2689	64.32	141 (15.04)	pRhico091; gb AAS83079.1	Unknown		
04	3667	3116	61.96	183 (20)		Unknown		Hypothetical protein PdenDRAFT_1787 (<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222); gb ABL71813.1; 35% (9E-12)
05	3961	4110	61.33	49 (5.09)	pRhico090; gb AAS83078.1	Unknown		
06	4352	5353	63.27	333 (36.95)	pRhico089; gb AAS83077.1	Unknown		
07	5353	5793	63.72	146 (16.02)	pRhico088; gb AAS83076.1	Unknown		
08	5790	6011	66.22	93 (8.08)	pRhico087; gb AAS83075.1	Unknown		
09	6011	6430	67.14	139 (15.48)	pRhico086; gb AAS83074.1	Phage protein ⁴	IPR009414	Phage-like protein (<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419); gb EAU04543.1; 41% (2E-14)
10	6427	6675	56.63	82 (9.56)	pRhico085; gb AAS83073.1	Unknown ¹	IPR010978	Hypothetical protein FP2506_05451 (<i>Fulvmarina pelagi</i> HTCC2506); gb EAU42258.1; 62% (9E-23)
11	6685	7041	68.35	118 (12.8)	pRhico084; gb AAS83072.1	Epoxidase-like protein ¹	IPR001387	Helix-turn-helix domain protein, putative (<i>Roseobacter denitrificans</i> OCH 114); gb ABG33351.1; 37% (3E-04)
12	7148	7708	69.16	186 (19.9)	pRhico083; gb AAS83071.1	Unknown		
13	7705	8346	68.54	213 (23.31)		Unknown ¹		Gp42 (bacteriophage phiKO2); gb AAR83058.1; 36% (6E-25)
14	8772	8551	64.86	73 (7.12)		Unknown		Hypothetical protein BradDRAFT_2696; ref ZP_00862035.1; 45% (4E-07)
15	8986	9861	63.01	291 (32.26)		Unknown		Protein of unknown function DUF1376 (<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222); gb EAN65374.1; 29% (2E-12)
16	9737	10420	69.3	227 (24.99)	pRhico082; gb AAS83070.1	Unknown		
17	10402	10803	64.68	133 (24.99)	pRhico081; gb AAS83069.1	Unknown		
18	10981	11316	66.96	111 (12.38)		Unknown		Regulatory protein, LuxR:response regulator receiver (<i>Frankia</i> sp. strain EAN1pec); gb EAN13980.1; 37% (4E-05)
19	11271	11774	69.64	167 (18.08)	pRhico080; gb AAS83068.1	dCMP deaminase ¹	IPR002125	Deoxycytidylate deaminase (<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1); ref YP_422060.1; 50% (4E-19)
20	11771	12160	67.18	129 (14.13)		Unknown		Similar to hypothetical protein ABO_0763 (<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2); ref YP_692483.1; 40% (2E-19)
21	12672	13472	68.66	266 (29.6)	pRhico079; gb AAS83067.1	Unknown		
22	13712	14257	65.2	181 (19.78)	pRhico078; gb AAS83066.1	Unknown		
23	14353	14589	64.56	78 (8.6)		Unknown		
24	14586	14876	63.92	96 (10.06)		Unknown		
25	14873	15136	66.29	87 (9.22)	pRhico077; gb AAS83065.1	Unknown		
26	15333	16004	61.16	223 (25.78)	pRhico076; gb AAS83064.1	Putative prophage protein ⁴		Uncharacterized protein L246 (<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>); gb AAV50518.1; 26% (3E-18)
27	16038	16376	64.01	112 (12.55)		HNH endonuclease ¹	IPR003615	HNH endonuclease (<i>Burkholderia phymatum</i> STM815); gb EAU97146.1; 35% (2E-17)
28	16756	17223	61.97	155 (17.42)	pRhico075; gb AAS83063.1	Putative prophage protein ⁴		Hypothetical protein NB311A_02637 (<i>Nitrobacter</i> sp. strain Nb-311A); gb EAQ33369.1; 31% (5E-11)
29	17261	19012	62.44	583 (63.69)	pRhico074; gb AAS83062.1	Putative terminase ¹	IPR005021	Hypothetical phage terminase large subunit (<i>Roseobacter</i> sp. strain SK209-2-6); gb EBA18390.1; 43% (9E-124)
30	19027	19206	67.78	44 (4.46)	pRhico073; gb AAS83061.1	Putative prophage protein ⁴		

Continued on following page

indicating a close-packed genome. A total of 95 ORFs were predicted to encode proteins larger than 40 amino acids. Searches in databases indicated that: 65 ORFs (68.42%) code for hypothetical proteins, 16 ORFs (16.8%) display sequence similarity to proteins with unknown functions, and only 14 ORFs (14.73%) could be assigned functions based on protein homology (**Table 4.2 and Figure 4.5**). No tRNA genes have been identified.

At the onset of the annotation process, it was found that a region of 27,292 pb displayed 100% identity with part of the previously sequenced pRhico plasmid of strain *A. brasilense* Sp7, a strain highly related to *A. brasilense* Cd (see above) (Eskew *et al.*, 1977). The pRhico plasmid, also named p90 due to its molecular size estimated at 90 MDa, was shown to be present in several *A. brasilense* strains, including *A. brasilense* Cd (Michiels *et al.*, 1989; Vieille & Elmerich, 1990). Approximately 95% (151.3 kb) of the pRhico sequence has been described in 5 contigs that were not assembled (Vanbleu *et al.*, 2004). Hence, the whole sequence of pRhico contig 3 (6,171 pb) and 98% of pRhico contig 4 (21,130 out of 21,577 kb) matched a part of the Φ Ab-Cd sequence (**Figure 4.5**). Two explanations could account for this finding: (i) Φ Ab-Cd is integrated as a prophage in the pRhico plasmid, but this would imply that the pRhico sequence has not been entirely described, or (ii) Φ Ab-Cd is integrated elsewhere in the genome as a prophage and part of Φ Ab-Cd (18.3%) is duplicated within the pRhico. Subsequent experiments (see below) will allow retaining one of these hypothesis. ORF prediction performed in our study allowed the identification of similar ORFs than already predicted for contigs 3 and 4 of pRhico, but additional ORFs were found (**Table 4.2**).

Even if the majority of the putative ORFs identified codes for hypothetical proteins or for proteins without assigned functions, some genes encode putative phage proteins that have conserved functional domains and that could be grouped in four classes: proteins involved in DNA processing, proteins involved in phage morphogenesis, proteins related to bacterial lysis, and putative phage proteins. Nine ORFs could be ascribed a function related to DNA processing (ORFs 10, 11, 13, 19, 27, 29, 57, 72, 91, see **Table 4.2**). The deduced protein encoded by ORF10, although displaying 82% identity with conserved bacterial proteins with unassigned function (COG3750.2), possesses a conserved domain matching with tRNA-binding arm, a domain found in aminoacyl tRNA-synthetases. ORF11, could encode a protein showing homology with epoxidase-like protein. A search for conserved domains revealed a putative helix-turn-helix type 3 DNA binding domain (Interpro IPR 001387), identified in proteins belonging to the Lambda repressor-like family; thus the product encoded by ORF11 could act as a transcriptional repressor like the regulators Cro and cI that control the life cycle of the Lambda bacteriophage. Site-specific DNA methylase domains involved in DNA

Table 4.2-Continued

ORF	Start base position	End base position	% GC	No. of aa ^a (kDa)	Identity with pRhico ^b ; GenBank accession no.	Predicted function ^c	INTERPRO family ^d	Most significant database match; GenBank or RefSeq accession no.; % aa identity (E value) ^e
31	19206	20561	64.38	451 (49.02)	pRhico072; gb AAS83060.1	Portal protein ²	IPR006427	Putative portal protein (<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419); gb EAU08565.1; 43% (2E-93)
32	20558	21247	62.75	229 (24.7)		Phage head maturation protease ²	IPR006433	Peptidase U35, phage prohead HK97 (<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2); gb EAS16378.1; 48% (7E-41)
33	21260	22636	66.09	458 (48.93)		Phage major capsid protein ²	IPR006444	Phage major capsid protein, HK97 (<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2); gb EAS16379.1; 61% 1E-144
34	22706	23131	65.96	141 (14.86)		Unknown		Hypothetical protein Mpe_A0539 (<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1); gb ABM93501.1; 53% (5E-32)
35	23170	23427	66.28	85 (8.13)		Unknown		
36	23427	23732	66.99	101 (10.8)		Unknown		
37	23735	24400	67.27	221 (23.84)		Unknown		Hypothetical protein mlr8529 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099); ref NP_108605.1; 28% (4E-10)
38	24397	24720	62.96	107 (11.65)		Unknown		
39	24938	24522	62.35	138 (15.22)		Unknown		
40	25382	26854	63.75	490 (51.88)		Unknown		gp78 (bacteriophage ΦJL001); gb AAT69470.1; 27% (2E-14)
41	26902	27393	65.65	163 (17.89)		Unknown		
42	27769	28452	63.16	227 (25.17)		Unknown		Hypothetical protein mlr8531 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099); ref NP_108607.1; 37% (4E-09)
43	29170	30147	62.27	325 (35.78)		Unknown		Hypothetical protein EcolE_01003641 (<i>Escherichia coli</i> E24377A); ref ZP_00703609.1; 47% (1E-22)
44	30128	30574	59.73	148 (16.57)		Unknown		Hypothetical protein XautDRAFT_4299 (<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2); ref ZP_01196156.1; 32% (1E-09)
45	30581	31009	65.27	142 (15.39)		Unknown		
46	31526	31071	49.78	151 (16.61)		Unknown		
47	31654	36042	62.36	1462 (154.37)		Unknown		
48	36039	37733	66.02	564 (60.05)		Unknown		
49	37792	40539	63.54	915 (95.53)		Unknown		
50	40549	41130	64.43	193 (19.75)		Tail fiber protein ²		Tail fiber protein, putative (<i>Polaromonas</i> sp. strain JS666); ref YP_550528.1; 29% (5E-10)
51	41140	41826	60.55	228 (24.33)		Unknown		Hypothetical cytosolic protein (<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB); ref YP_460612.1; 37% (4E-08)
52	41830	42114	65.26	94 (9.55)		Unknown		
53	42188	42634	66.44	148 (15.71)		Phage-related lysozyme ³	IPR002196	Phage-related lysozyme (<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1); ref YP_423349.1; 56% (1E-28)
54	43206	43628	56.97	140 (43.21)		Unknown		
55	43632	43901	61.11	89 (9.78)		Unknown		
56	43915	44091	63.84	58 (6.22)		Unknown		
57	45392	45069	58.33	107 (12.08)		Unknown ¹	IPR001387	Hypothetical protein MELB17_01400 (<i>Marinobacter</i> sp. strain ELB17); gb EBA01392.1; 43% (5E-15)
58	45736	46467	67.08	243 (25.27)		Unknown		
59	47405	46746	65.45	219 (23.81)		Unknown		
60	47662	47402	66.28	86 (9.36)		Unknown		
61	47997	47659	63.42	112 (11.96)		Unknown		
62	48293	47994	66.67	99 (10.85)		Unknown		
63	48921	48286	62.74	211 (23.13)		Unknown		

Continued on following page

modification have been identified in the two putative proteins encoded by ORF13 and ORF91. The product encoded by ORF19 exhibits high similarities with deoxycytidylate deaminase-like proteins that catalyze the deamination of dCMP into dUMP. The deduced product of ORF27 is homologous to endonucleases of the HNH family found in several phages (such as LambdaSa2 from *Streptococcus agalactiae* and bIL170 from *Lactococcus* spp.). ORF29 is likely to encode the phage terminase large subunit, an enzyme that is part of a large nucleoprotein complex dedicated to packaging. The integrase function allowing DNA recombination and phage integration process was ascribed to the product encoded by ORF72; showing best identities with α -proteobacteria like *Oceanicola granulosus* HTCC2516 (35% identity, Accession number ZP_01157933) and *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (37% identity, Accession number YP_422072) a bacterium taxonomically related to the *Azospirillum* genera.

Deduced proteins of ORFs 31, 32, 33 and 50 revealed structural proteins commonly found in phage particles. ORF31 encodes a putative portal protein, the best identity being with a putative portal protein of *Sinorhizobium medicae* WSM419 (43%, Accession number ZP_01412930). The deduced amino acid sequence of ORF32 displays strong similarity with phage prohead proteases that are involved in the processing of the prohead protein. ORF33 may encode the major component of the phage capsid, as it belongs to the family of head proteins of many bacteriophage like HK97, phi-105, P27 (Interpro IPR 006444). The deduced protein of ORF50 shares similarity with phage tail proteins but no conserved domain could be identified.

As for functions related to bacterial lysis, only one product encoded by ORF53 could be assigned to this process; indeed, this protein revealed similarities with members of the glycoside hydrolase family, i.e. lysozyme (Interpro IPR 002196). Finally, the fourth class of ORFs encoding putative phage protein includes ORF9, ORF26, ORF28 and ORF30.

Phylogenetic analysis of functional genes.

Phage particle observations have revealed a morphology that is typical of the *Siphoviridae* family of bacteriophages. Information about the genus can be established by analyzing phylogenetic relationships of Φ Ab-Cd with other functional *Caudovirales* phages. It has been suggested that phylogenetic analysis should be performed at the level of individual genes in order to resolve viral taxonomical issues (Lawrence *et al.*, 2002). Indeed, as bacteriophages are known for horizontal exchange of functional genetic elements drawn from a large shared pool (Hendrix, 2003; Silander *et al.*, 2005), any phage-specific protein could be obtained by a single modular interchange during evolution. Therefore, four proteins of Φ Ab-

Table 4.2-Continued

ORF	Start base position	End base position	% GC	No. of aa ^a (kDa)	Identity with pRhico ^b ; GenBank accession no.	Predicted function ^c	INTERPRO family ^d	Most significant database match; GenBank or RefSeq accession no.; % aa identity (E value) ^e
64	49291	48914	62.17	125 (13.37)		Unknown		Hypothetical protein NB311A_07313 (<i>Nitrobacter</i> sp. strain Nb-311A); ref ZP_01044934.1; 43% (5E-05)
65	49306	49743	63.47	145 (16.75)		Unknown		
66	49766	50185	63.81	139 (15)		Unknown		
67	50213	50446	65.81	77 (8.27)		Unknown		
68	50476	50682	59.42	68 (7.49)		Unknown		
69	50672	51115	64.19	147 (16.13)		Unknown		Conserved hypothetical protein (<i>Escherichia coli</i>); gb ABF67882.1; 32% (2E-07)
70	51396	51145	70.63	83 (8.56)		Unknown		
71	51701	51393	63.11	102 (11.69)		Unknown		
72	52642	51755	61.37	295 (33.47)		Integrase ¹	IPR002104	Integrase (<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1); ref YP_422072.1; 37% (2E-39)
73	52919	52653	64.04	88 (9.58)		Unknown		
74	52957	53424	64.1	155 (16.56)		Unknown		
75	53783	53547	67.51	78 (8.33)		Unknown		
76	54219	53776	64.19	147 (15.76)		Unknown		
77	54398	54216	60.11	60 (6.78)		Unknown		
78	54831	54514	70.13	105 (11.6)		Unknown		
79	55269	54838	66.2	143 (15.03)		Unknown		
80	55862	55293	56.14	189 (21.17)		Unknown		
81	56251	55901	61.54	116 (13.1)		Unknown		
82	56325	56579	63.14	84 (9.27)		Unknown		
83	57121	56576	63.92	181 (20.11)	pRhico071; gb AAS83033.1	Unknown		
84	57507	57085	65.72	140 (15.82)		Unknown		
85	58574	57504	63.49	356 (39.15)	pRhico070; gb AAS83032.1	Unknown		
86	59328	58528	68.04	266 (28.65)	pRhico069; gb AAS83031.1	Unknown		
87	59528	59325	68.14	67 (7.23)		Unknown		
88	59770	59534	64.14	78 (8.34)	pRhico068; gb AAS83030.1	Unknown		
89	60028	59861	64.29	55 (5.73)	pRhico067; gb AAS83029.1	Unknown		
90	60408	60025	63.02	127 (14.36)	pRhico066; gb AAS83028.1	Unknown		
91	60512	60745	61.97	77 (8.4)		Unknown ¹	IPR002052	
92	61144	60881	62.88	87 (9.81)		Unknown		
93	61377	61141	70.04	78 (8.34)		Unknown		
94	61756	61379	65.08	125 (13.74)	pRhico065; gb AAS83027.1	Unknown		
95	62234	61839	66.92	131 (14.34)		Unknown		

^a For ORFs displaying 100% identity with previously identified pRhico ORFs, the second most significant database match is shown.

^b For the ORFs with assigned functions, the encoded protein could be grouped in four classes: proteins involved in DNA processing (1), proteins involved in phage morphogenesis (2), proteins related to bacterial lysis (3), and putative phage proteins (4).

^c The analysis was done using INTERPROSCAN software (Zdobnov & Apweiler, 2001).

^d These results were obtained using the BLASTX search.

Cd, including terminase (ORF29), phage major capsid protein (ORF33), lysozyme (ORF53), and integrase (ORF72), which are commonly present in tailed phages, were chosen to build phylogenetic trees. Homologous proteins sequences except for the phage major capsid protein have been identified from the draft of the genome of Sp245 strain and are likely to be components of Φ Ab-Sp245, as corresponding genes lie in a region containing phage ORFs whose length matches the estimated size of Φ Ab-Sp245 observed here by PFGE. These sequences have been compared with those of functional *Caudovirales* phages deposited in GenBank in order to construct phylogenetic trees shown in **Figure 4.6**. Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp245 lie on the same branch in the tree based on integrase, lysozyme, and terminase but are not as closely related as other phages isolated from the same bacterial species, like *Salmonella* or *Staphylococcus* phages. All trees show that Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp245 are deeply rooted, suggesting that they are quite different from previously described phages. The low values of bootstrap for the deep branches indicate that these phage proteins have diverged to an extent that prevents determining their evolutionary relatedness and therefore, to classify *Azospirillum brasilense* phages in known genera.

Genome localization of Φ Ab-Cd prophage.

Genome comparison of Φ Ab-Cd and pRhico sequences have revealed that both entities encompassed 43.8% (27.3 kb) identical region. Given the relatedness between strain *A. brasilense* Cd and strain *A. brasilense* Sp7 (strain Cd being isolated as a scarlet variant of strain Sp7 after inoculation on plant) (Eskew *et al.*, 1977; Tarrand *et al.*, 1978), and the homology between the two phages isolated from those strains (see above), the same genetic organisation could be expected in both strains. This implied that either Φ Ab-Cd was integrated as a prophage in plasmid pRhico or that a region of the prophage was duplicated in the *A. brasilense* Cd genome. To test this hypothesis, PCR amplifications of ORF40, ORF50 and ORF53 of Φ Ab-Cd were carried out from DNA isolated from Φ Ab-Cd, Φ Ab-Sp7, Φ Ab-Wb1 and Φ Ab-Sp245. PCR fragments of the expected size were obtained from DNA isolated from Φ Ab-Cd and from Φ Ab-Sp7, sustaining the hypothesis that Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp7 genomes are strongly related (data not shown). No amplification products could be obtained from DNA isolated from Φ Ab-Wb1 and Φ Ab-Sp245, suggesting that these ORFs are absent from these phages or have divergent sequences. To determine on which replicons Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp7 were integrated, a separation of plasmids was performed (see Materials and Methods), followed by Southern hybridization experiments. First, an identical plasmid pattern was observed for strains *A. brasilense* Cd and Sp7, and coincided with the pattern previously described with sizes of replicons estimated at 130, 570, 630, 1700 and >1800 kb

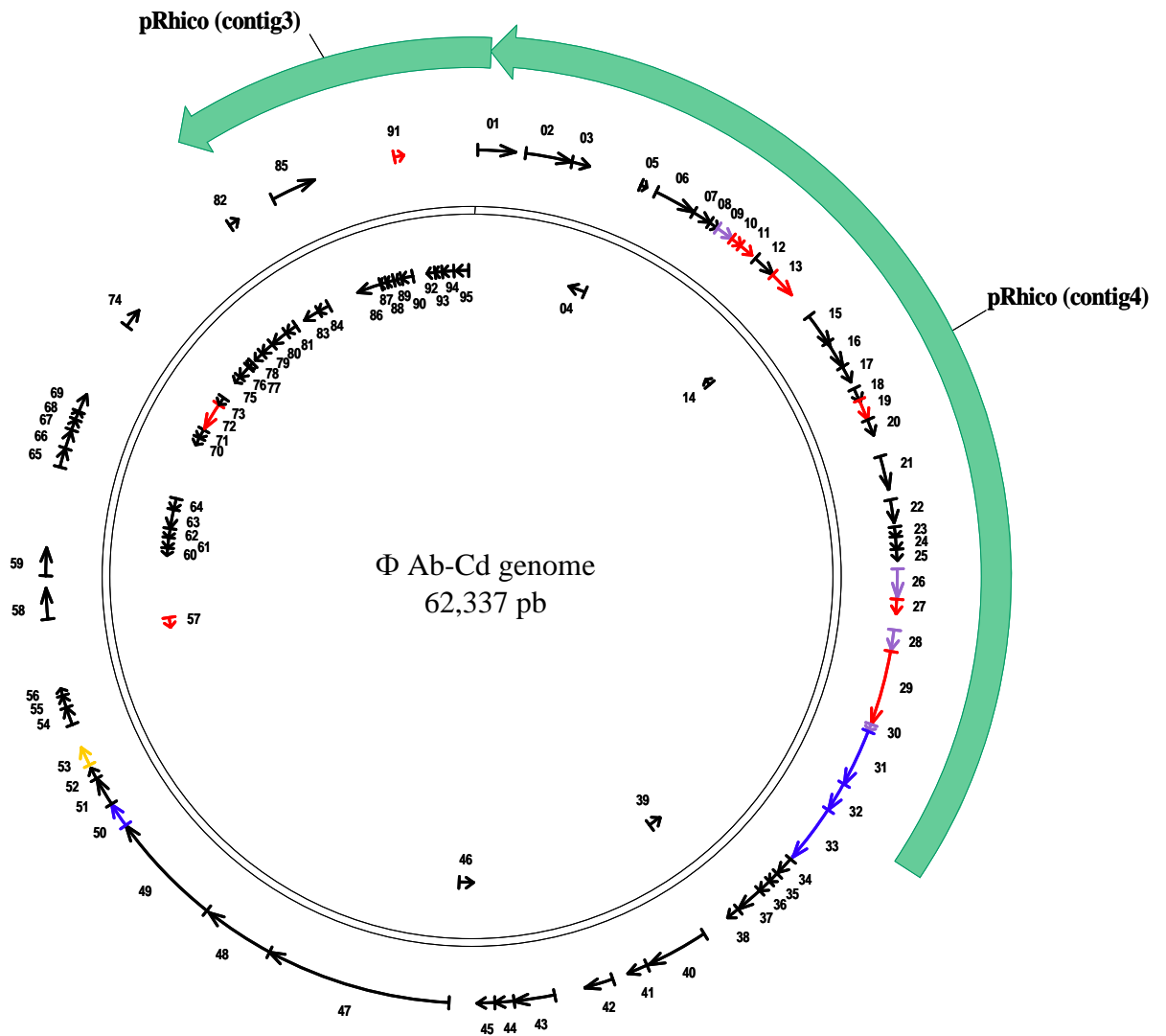


Figure 4.5: Genome map of Φ Ab-Cd and homology with pRhico.

The double black circle represents the circular DNA molecule of Φ Ab-Cd genome. The predicted ORFs are depicted by thin arrows or arrowheads pointing in the direction of transcription and are numbered consecutively (see table 2). ORF encoding hypothetical protein (no homologs in BLAST-P searches) are represented by black thin arrows. The ORFs encoding proteins with assigned functions are represented by coloured thin arrows: DNA processing (red), phage morphogenesis (blue), bacterial lysis (yellow), and putative phage proteins (purple). ORF whose deduced product display high similarity with proteins in BLAST-P searches are represented by red thin arrows. Homologies between Φ Ab-Cd sequence and contigs of pRhico are represented by thick green arrows.

(Figure 4.7A) (Caballero-Mellado *et al.*, 1999). Second, an hybridization experiment performed with *exoC* as a probe, an ORF specific to pRhico (Vanbleu *et al.*, 2004), enabled to identify pRhico as being the 130-kb plasmid of both Sp7 and Cd strains (data not shown). Third, ORF50 of Φ Ab-Cd, when used as a probe, clearly hybridized with the 570-kb plasmid of both Sp7 and Cd strains but no signal was obtained with the pRhico (Figure 4.7B). These observations indicate that Φ Ab-Cd / Φ Ab-Sp7 are not integrated as prophages in pRhico but in a larger replicon of 570 kb. These results also imply that a region of 27.3 kb spanning over contig 3 and 4 of pRhico (Figure 4.5) is duplicated in the genomes of the two strains and that this duplication is located on the pRhico.

Discussion

Prevalence and morphology of *Azospirillum* bacteriophages.

This study clearly demonstrates the prevalence of bacteriophages among the *Azospirillum* genus. By exposing cells to mitomycin C, bacterial lysis due to the release of phage particles was observed for eleven strains out of the 24 strains analysed (i.e. 4/11 *A. brasilense*, 6/11 *A. lipoferum*, 1/1 *A. doebereineriae* and 0/1 *A. irakense*). The induction of bacteriophages was not observed for eleven strains, indicating that either these strains do not host any prophage or that some *Azospirillum* hosted-prophages are not induced by the SOS response. Only for two strains, cell lysis could not be clearly correlated to the release of phage particles. Cell lysis upon mitomycin C treatment was previously described for several strains of *A. brasilense* and *A. lipoferum* but the production of phage particles was clearly evidenced only for *A. brasilense* Sp7 (Franche & Elmerich, 1981). The spontaneous induction of bacteriophage during growth of *A. brasilense* Sp7 in complex media was also reported (Germida, 1984).

TEM analysis revealed two types of bacteriophages displaying ultrastructural features that are typical of the *Siphoviridae* family. Identical features were previously described for the bacteriophage of *A. brasilense* Sp7 (Germida, 1984). The two types can be distinguished not only by the size of particles, but also by the size of encapsidated DNA and by the duration of the eclipse period upon induction by mitomycin C. Moreover, each type of bacteriophages seems to be associated with a specific bacterial species, as only “big” phages were evidenced for *A. brasilense* and “small” phages for *A. lipoferum* strains. This finding could be related to the usually narrow host-range of a given bacteriophage, limited to a bacterial species or strain (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Germida, 1984).

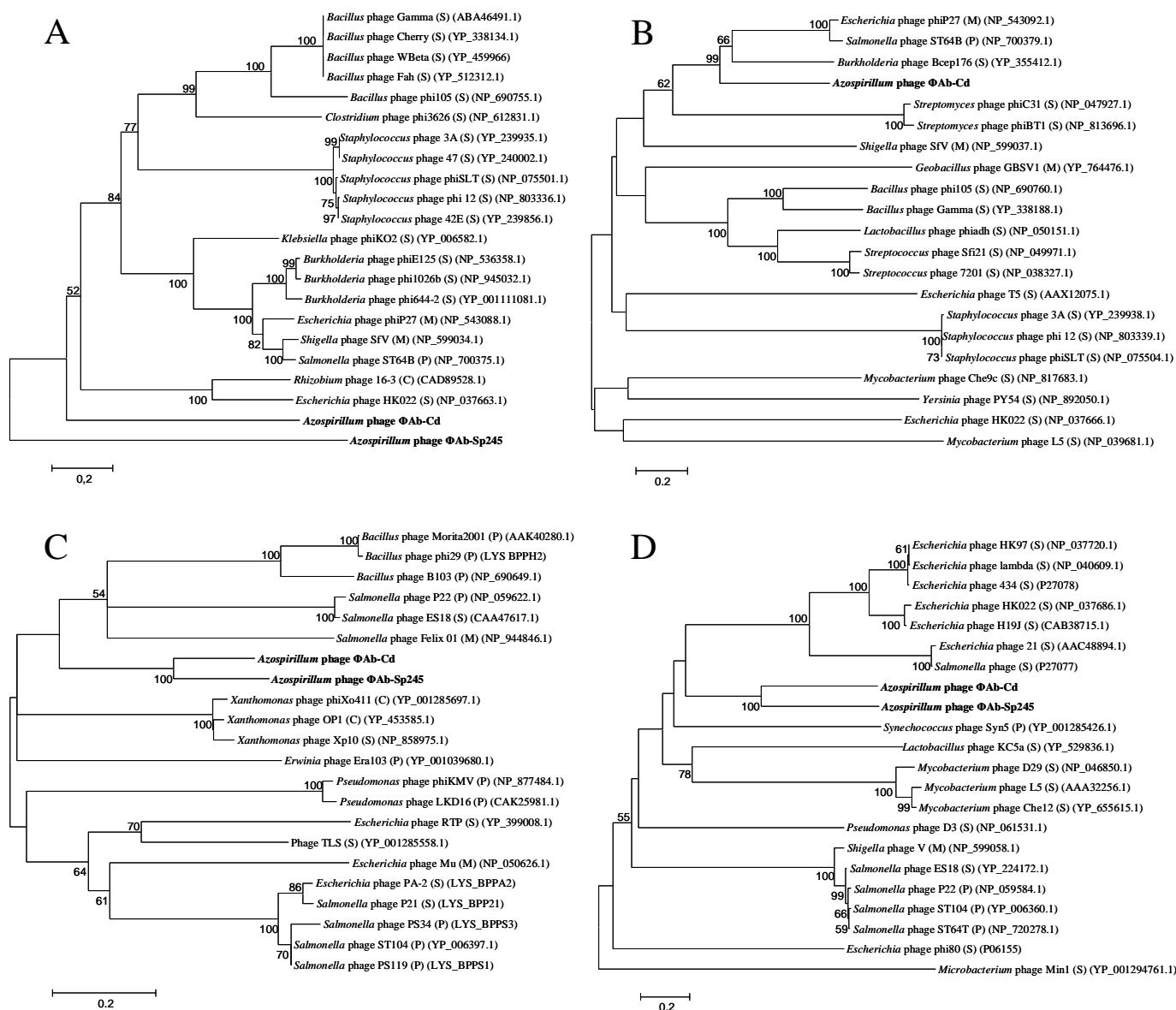


Figure 4.6: Unrooted neighbour-joining trees based on the aligned amino acid sequences encoded by four phage genes.

Only genomes data obtained from virions were used. (A) Terminase, (B) major capsid protein, (C) lysozyme, and (D) integrase from Φ Ab-Cd, Φ Ab-Sp245 (no protein homologous to major phage protein could be identified in the *A. brasilense* Sp245 draft genome) and from 20 other phages. A Blosum 30 matrix was calculated with a gap penalty of 10.0. The numbers at the nodes are bootstrap values based on 1,000 resamplings. Bootstrap values less than 50 are not shown. Scale bar = 0.2 amino acid substitution per residue. M (*Myoviridae*), S (*Siphoviridae*), P (*Podoviridae*), C (Unclassified Caudovirales).

Relatedness among *Azospirillum* phage genomes.

Hybridization experiments suggested DNA homology between the phage genomes of Φ Ab-Cd, Φ Ab-Sp7 and Φ Ab-Wb1. Restriction profiles between Φ Ab-Cd and Φ Ab-Sp7 are identical and given the relatedness between those two strains, one can speculate that these two phages are identical. The homology between Φ Ab-Cd and Φ Ab-Wb1 is less striking as restriction profiles display only a few common bands. Genomes of *Siphoviridae* are usually organized into functional modules (i.e. multigenic interchangeable elements whose genes are involved in the same process, such as lysogeny module or tail genes module...), and such modules appear to be conserved among prophages hosted by the same species, as demonstrated by the genome analysis of six phages isolated from *Streptococcus thermophilus* (Brüssow & Desiere, 2001; Canchaya *et al.*, 2004). However, the organization of modules can differ from one phage genome to another, due to the accumulation of mutations and recombination events, leading to mosaic genomes. Such an organization might be found in the *A. brasilense* phages, explaining the differences in restriction profiles albeit strong DNA hybridization signals.

Strain *A. brasilense* Sp245 seems to host a prophage that is not genetically linked to Φ Ab-Cd, as shown by the absence of hybridization signal. Preliminary analysis of the draft Sp245 genome (available at <http://genomics.ornl.gov/research/azo>) is in accordance with this finding, as some putative phage ORFs display low or no similarity with the Φ Ab-Cd sequence obtained in this study. Comparative genomic analysis conducted on 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages and 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages showed that some prophages hosted by strains of the same species are highly homologous, while other display very little homology (Kwan *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2006). So, phage diversity within a bacterial species is not restricted to the *A. brasilense* species. This diversity is even more obvious at the genus level as prophages hosted by *A. lipoferum* strains do not share any common sequences with prophages hosted by the *brasilense* species. On the contrary, the phage hosted by the *A. doebereineriae* strain might share common sequences with Φ A1-B518, and this can probably be attributed to the genetic proximity between those two species (Eckert *et al.*, 2001).

One of the most striking features of the *A. lipoferum* phages induced in this study is the small size of encapsidated DNA (about 10 kb). Genome sizes of *Siphoviridae* usually range from 18 kb to 500 kb (Casjens); indeed the smallest genome of a *Siphoviridae* phage described in NCBI is 14,957 pb (Phage bIL310 of *Lactococcus lactis* IL1403, Accession number AF323671). Restriction of *A. lipoferum* phage DNAs by various enzymes always yielded to smears; moreover attempts to clone and sequence those DNAs failed to give data

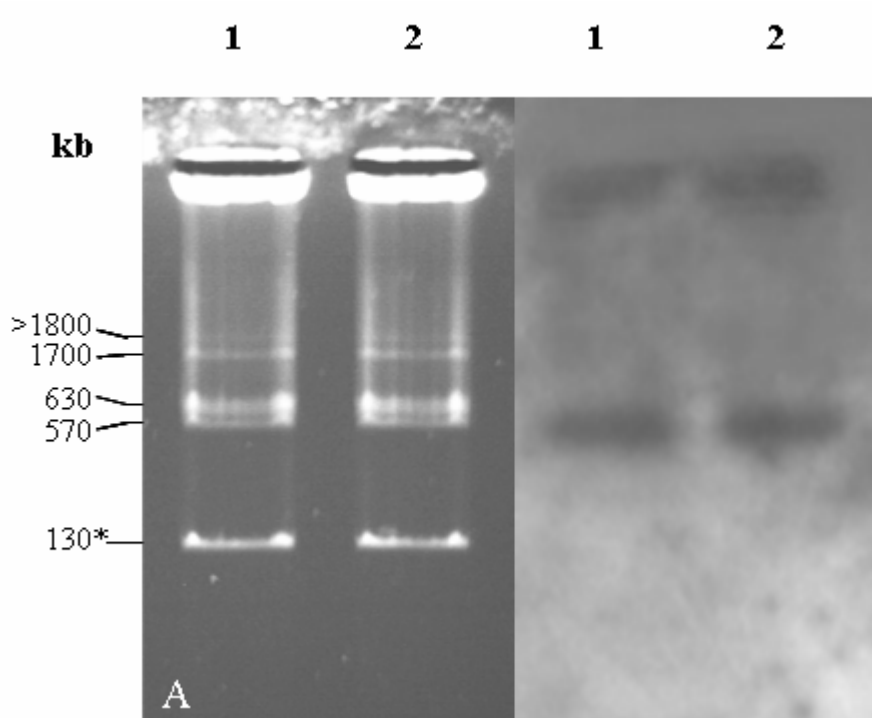


Figure 4.7: Genome localization of Φ Ab-Cd.

Plasmids of strains *A. brasilense* Cd (lane 1), Sp7 (lane 2) were separated (A) and hybridized with ORF50 of Φ Ab-Cd (B). The pRhico plasmid is indicated by an asterisk.

that could be assembled. All these observations seem to be in favour of prophage-like gene transfer agents, rather than real prophages. In contrast to functional prophages, gene transfer agents (GTA) typically package bacterial genome fragments and atypically package a portion of their own genome and constitute the conspicuous mechanisms of generalized transduction (Stanton, 2007). Bioinformatic analysis showed that GTA are widely distributed within alpha-proteobacteria, especially in the Rhodobacterales (Lang & Beatty, 2007). However, this hypothesis needs to be experimentally validated.

Phage genome sequence.

The complete genome sequence of Φ Ab-Cd obtained in this study constitutes the first description of an *Azospirillum* bacteriophage. The annotation process of Φ Ab-Cd genome revealed many ORFs (81 out of 95) encoding either hypothetical proteins or conserved proteins with unknown functions; this result might be attributed to the low number of alpha-proteobacteria bacteriophages actually described. Indeed, only three sequences of phages were obtained through complete genome sequencing, i.e. phage phi JL001 of a marine alpha proteobacterium, phage SIO1 of *Roseobacter* SIO67, and phage PBC5 of *Sinorhizobium meliloti* (Lohr *et al.*, 2005; Rohwer *et al.*, 2000). Over the 14 ORFs of Φ Ab-Cd to which a function could be attributed, 11 display homology with phage ORFs found in alpha-proteobacteria whole genomes but none was homologous to ORFs specific to phages of other bacterial classes. This could be due to high rates of sequence divergence and to the narrow host range of bacteriophages. Interestingly, a function can be attributed to only about 25% of the ORFs even when several sequences of prophages hosted by the same species are available, as illustrated with prophages of *S. aureus* or *Mycobacterium tuberculosis* (Kwan *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2006; Pedulla *et al.*, 2003). Thus phages can be considered as a rich reservoir for new proteins. Some of the ORFs encoding hypothetical proteins could be lysogenic conversion genes, contributing to increase bacterial fitness; such a case is observed for many bacterial pathogens whose virulence factors are phage-encoded (Brüssow & Hendrix, 2002; Canchaya *et al.*, 2003b). However, some of the ORFs identified here encode functions that are essential in the lytic phage cycle, such as proteins for particles formation (structural proteins, terminase), proteins for bacterial lysis (lysozyme) and proteins for integration/excision (integrase). Using such proteins to resolve the taxonomy of Φ Ab-Cd proved to be unsuccessful, a result that emphasizes the problems associated with mosaicism of viral genomes while using sequence data for taxonomical purposes (Lawrence *et al.*, 2002). The identification of functional modules remained difficult due to the low number of ORFs

with an attributed function, but ORF26 to ORF33 could constitute a conserved genetic module encoding structural and maturation proteins.

Phages and dynamics of bacterial genomes and bacterial community.

Φ Ab-Cd is found integrated on a 570-kb plasmid; whether this plasmid is conjugative or not is not known but this could imply a putative horizontal transfer of phage DNA by conjugation. A 27.3 kb-fragment of Φ Ab-Cd is also recovered within another replicon, the pRhico plasmid, indicating that genomic rearrangements occurred between plasmids and phages leading to a duplication event. Major genomic rearrangements were previously characterized for several *Azospirillum* strains undergoing phenotypic switch, demonstrating genome plasticity among the *Azospirillum* genus (Vial *et al.*, 2006b). Bacteriophages could thus account for dynamics and evolution of *Azospirillum* genomes, and could be major contributors to the genetic individuality of *Azospirillum* strains as described previously for other species (Canchaya *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2001).

Phage particles formation was induced here *in vitro* by the SOS-inducing agent mitomycin C; it would be of interest to study phage/*Azospirillum* interactions within the rhizosphere, the natural habitat of *Azospirillum*. Indeed environmental abiotic factors, such as nutrients and temperature, were shown to induce bacteriophage in *A. brasilense* Sp7 (Germida, 1984). Eukaryote-bacteria interactions may also influence the cycle of phages; for examples, a lysogenic avian *E. coli* pathogen, showed an upregulation of phage gene expression when injected into a chicken (Dozois *et al.*, 2003) and phage genes were shown to respond to molecular cues emitted by the mammalian host of the pathogen *S. pyogenes* (Broudy *et al.*, 2001). Moreover, up-regulation of phage-derived genes has been observed during promoter trap studies of *Ralstonia solanacearum* grown in the presence of tomato and *A. brasilense* induced by wheat extracts (Brown & Allen, 2004; Pothier *et al.*, 2007). The fact that bacteriophages can be induced in natural conditions has a considerable impact on bacterial densities; such an impact has been demonstrated for virus in aquatic environments (Suttle, 2005; Weinbauer, 2004; Wommack & Colwell, 2000) and by releasing artificially a *Serratia liquefaciens* lysogen into soil samples (Ashelford *et al.*, 2000). Despite a previous study showing no effect on the declines of strains *A. brasilense* Sp7 and Cd in soil inoculated with the Sp7 phage (Germida, 1986), the potential role of bacteriophages in population dynamics of *Azospirillum* and of rhizospheric bacterial community cannot be excluded. Also, the presence of prophage might provide immunity to infection by any other bacterial virus. Finally, this work might help optimize the use of bacteriophages as a tool for *Azospirillum* genetic studies.

Acknowledgements

We thank P. Bustos (Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico) for her contribution to the genome analysis and I. B. Zhulin (The University of Tennessee and Oak Ridge National Laboratory, USA) for access to preliminary genome sequence data of *A. brasilense* Sp245, which is supported by the US National Science Foundation grant EF-0412186 to I.B.Z. We are also thankful to P. Normand (from UMR5557, Ecologie Microbienne) for helpful discussions. Part of this work was made possible by an agreement between the Laboratoire d'Ecologie Microbienne and the service of "Cooperation Scientifique et Technologique" of the French Embassy of Mexico. Electron microscopy was performed at the "Centre Technologique des Microstructures" of the Université Lyon1. This work was supported by a fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et des Nouvelles Technologies to M. B.

References

- Alexandre, G., Rohr, R. & Bally, R. (1999).** A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4701-4704.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Ashelford, K. E., Norris, S. J., Fry, J. C., Bailey, M. J. & Day, M. J. (2000).** Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4193-4199.
- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A. B., Baldani, J. I. & Doëbereiner, J. (1986).** Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* **90**, 37-40.
- Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T., Balandreau, J., Richard, J. & de Ley, J. (1983).** Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* **29**, 881-887.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. & de la Cruz, F. (1991).** Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**, 75-78.

- Bashan, Y., Holguin, G. & de-Bashan, L. E. (2004).** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* **50**, 521-577.
- Beilstein, F. & Dreiseikelmann, B. (2006).** Bacteriophages of freshwater *Brevundimonas vesicularis* isolates. *Res Microbiol* **157**, 213-219.
- Beringer, J. F. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Broudy, T. B., Pancholi, V. & Fischetti, V. A. (2001).** Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group a streptococci during coculture with human pharyngeal cells. *Infect Immun* **69**, 1440-1443.
- Brown, D. G. & Allen, C. (2004).** *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Mol Microbiol* **53**, 1641-1660.
- Brüssow, H. & Desiere, F. (2001).** Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol Microbiol* **39**, 213-223.
- Brüssow, H. & Hendrix, R. W. (2002).** Phage genomics: small is beautiful. *Cell* **108**, 13-16.
- Caballero-Mellado, J., López-Reyes, L. & Bustillos-Cristales, R. (1999).** Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 283-288.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. & Brussow, H. (2003).** Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 238-276.
- Canchaya, C., Fournous, G. & Brüssow, H. (2004).** The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* **53**, 9-18.
- Casjens, S. R. (2005).** Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **8**, 451-458.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L. & Brüssow, H. (2004).** Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* **186**, 3677-3686.
- Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O. & Salzberg, S. L. (1999).** Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* **27**, 4636-4641.
- Dobbelaere, S., A., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D. & other authors (2001).** Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* **28**, 871-879.

- Dozois, C. M., Daigle, F. & Curtiss, R., 3rd (2003).** Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 247-252.
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001).** *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 17-26.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2001).** Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5285-5293.
- Elmerich, C., Quiviger, B., Rosenberg, C., Franche, C., Laurent, P. & Döbereiner, J. (1982).** Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum*. *Virology* **122**, 29-37.
- Eskew, D. L., Focht, D. D. & Ting, I. P. (1977).** Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl Environ Microbiol* **34**, 582-585.
- Ewing, B. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**, 175-185.
- Franche, C. & Elmerich, C. (1981).** Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. *Ann Microbiol (Paris)* **132A**, 3-18.
- Germida, J. J. (1984).** Spontaneous induction of bacteriophage during growth of *Azospirillum brasilense* in complex media. *Can J Microbiol* **30**, 805-808.
- Germida, J. J. (1986).** Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. *Plant Soil* **90**, 117-128.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195-202.
- Hendrix, R. W. (2003).** Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* **6**, 506-511.
- Hynes, M. F. & McGregor, N. F. (1990).** Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* **4**, 567-574.

- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. & Bally, R. (1999).** Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can J Microbiol* **45**, 339-342.
- Kabir, M., Faure, D., Heulin, T., Achouak, W. & Bally, R. (1995).** *Azospirillum* populations in soils infested by a parasitic weed (*Striga*) under *Sorghum* cultivation in Mali, West Africa. *Eur J Soil Biol* **32**, 157-163.
- Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P. A. & Kaiser, P. (1989).** *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol* **140**, 679-693.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. & other authors (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225-1240.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. & Pelletier, J. (2005).** The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5174-5179.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. & Pelletier, J. (2006).** Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol* **188**, 1184-1187.
- Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2007).** Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **15**, 54-62.
- Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. (2002).** Imbroglis of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J Bacteriol* **184**, 4891-4905.
- Lohr, J. E., Chen, F. & Hill, R. T. (2005).** Genomic analysis of bacteriophage PhiJL001: insights into its interaction with a sponge-associated alpha-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1598-1609.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F. & other authors (2005).** CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**, D192-D196.
- Martin-Didonet, C. C., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Kleina, M., Rego, F. G., Rigo, L. U., Yates, M. G. & Pedrosa, F. O. (2000).** Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J Bacteriol* **182**, 4113-4116.
- Michiels, K., De Troch, P., Onyeocha, I., Van Gool, A., Elmerich, C. & Vanderleyden, J. (1989).** Plasmid localization and mapping of two *Azospirillum brasilense* loci that affect exopolysaccharide synthesis. *Plasmid* **21**, 142-146.

- Nelson, L. M. & Knowles, R. (1978).** Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. *Can J Microbiol* **24**, 1395-1403.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K. & Hayashi, T. (2001).** Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors ? *Trends Microbiol* **9**, 481-485.
- Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M. & other authors (2003).** Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**, 171-182.
- Pothier, J. F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëgne-Loccoz, Y. & Prigent-Combaret, C. (2007).** Promoter trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* **153**, 3608-3622.
- Rohwer, F., Segall, A., Steward, G., Seguritan, V., Breitbart, M., Wolven, F. & Azam, F. (2000).** The complete genomic sequence of the marine phage Roseophage SIO1 shares homology with non-marine phages. *Limnol Oceanogr* **45**, 408-418.
- Romero, D., Brom, S., Martinez-Salazar, J., Girard, M. L., Palacios, R. & Dávila, G. (1991).** Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J Bacteriol* **173**, 2435-2441.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000).** Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)* **16**, 944-945.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis., T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Schnabel, E. L. & Jones, A. L. (2001).** Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 59-64.
- Silander, O. K., Weinreich, D. M., Wright, K. M., O'Keefe, K. J., Rang, C. U., Turner, P. E. & Chao, L. (2005).** Widespread genetic exchange among terrestrial bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 19009-19014.
- Stanton, T. B. (2007).** Prophage-like gene transfer agents-Novel mechanisms of gene exchange for *Methanococcus*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*, and *Rhodobacter* species. *Anaerobe* **13**, 43-49.
- Suttle, C. A. (2005).** Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R. & Döbereiner, J. (1978).** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* **24**, 967-980.
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J. & other authors (2005).** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13950-13955.
- Trân Vân, V., Berge, O., Faure, D., Bally, R., Hebbar, P. & Heulin, T. (1997).** A simple method for the isolation of *Azospirillum* strains associated with the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* **43**, 486-490.
- Vanbleu, E., Marchal, K., Lambrecht, M., Mathys, J. & Vanderleyden, J. (2004).** Annotation of the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* reveals its role in determining the outer surface composition. *FEMS Microbiol Lett* **232**, 165-172.
- Vial, L., Lavire, C., Mavingui, P., Blaha, D., Haurat, J., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R. & Wisniewski-Dyé, F. (2006).** Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*. *J Bacteriol* **188**, 5364-5373.
- Vieille, C. & Elmerich, C. (1990).** Characterization of two *Azospirillum brasilense* Sp7 plasmid genes homologous to *Rhizobium meliloti* nodPQ. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 389-400.
- Weinbauer, M. G. (2004).** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 127-181.
- Wommack, K. E. & Colwell, R. R. (2000).** Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 69-114.
- Zdobnov, E. M. & Apweiler, R. (2001).** InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics (Oxford, England)* **17**, 847-848.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

1. Rôle du QS chez *A. lipoferum*

Le QS fait souvent partie des mécanismes permettant de réguler les phénotypes impliqués dans les interactions des bactéries avec un hôte eucaryote. Le QS régule ainsi des fonctions écologiques différentes pouvant être à la fois utilisées par des bactéries pathogènes, symbiotiques ou coopératives. Chez les bactéries associées aux plantes, les AHLs régulent de nombreux phénotypes, tels que la mobilité, la capacité d'adhésion, la formation de biofilms, la production d'antibiotiques, le transfert conjugatif de plasmides, qui selon la nature de la bactérie, auront des effets bénéfiques ou non pour la plante hôte. Présent chez des bactéries dont les stratégies écologiques diffèrent, le QS module notamment l'expression de fonctions essentielles impliquées dans le passage des bactéries d'une vie libre à une vie en interaction avec l'hôte végétal.

Les travaux concernant l'étude du QS chez *Azospirillum* ont été initiés récemment. Ils avaient permis de mettre en évidence que seulement quatre souches sur quarante analysées produisent des AHLs, suggérant que cette forme de communication cellulaire était peu répandue chez *Azospirillum* (Vial *et al.*, 2006a). Ces quatre souches (TVV3, B518, B510 et B52) appartenant à l'espèce *lipoferum* ont toutes été isolées de la rhizosphère du riz. Différents résultats obtenus dans le cadre de l'étude de Vial *et al.* (2006) avaient suggéré l'existence de plusieurs systèmes QS chez *A. lipoferum* : (i) la quantité et la nature des AHLs produites sont différentes entre la souche TVV3 et les souches B518, B510 et B52 ; (ii) les gènes *alpR/alpI* de TVV3 (homologues aux gènes de type *luxR/luxI*) ne sont pas retrouvés chez les trois autres souches productrices d'AHLs, souches pour lesquelles les gènes du QS n'ont pu être identifiés.

Puisque la construction d'un mutant *alpI* chez TVV3 et l'identification des gènes impliqués dans la production d'AHLs chez les trois autres souches n'ont pas abouti (Vial, 2005), une approche alternative par quorum-quenching a été utilisée dans notre étude afin d'identifier les phénotypes régulés par QS. L'introduction d'une construction plasmidique contenant une lactonase dans les souches TVV3 et B518 a permis d'inactiver avec succès les différentes AHLs produites par ces souches. Cette approche constitue une alternative intéressante à la construction d'un mutant car une fois la construction plasmidique réalisée, cette dernière peut être introduite rapidement dans plusieurs souches d'intérêt ; une construction analogue a pu être introduite chez 45 souches appartenant à différentes espèces de *Burkholderia*, et a permis de mettre en évidence la conservation des phénotypes régulés

par QS au sein de ce genre (Wopperer *et al.*, 2006). Cependant, elle ne permet pas d'estimer le rôle respectif de chaque AHL-synthase lorsque plusieurs homologues de *luxI* sont présents dans le génome d'une même souche, ce qui pourrait être le cas pour les souches B518, B510, et B52. Les souches B518 et TVV3 exprimant une lactonase ont été utilisées pour identifier des fonctions régulées par QS : une première approche, ciblée, a consisté à analyser des phénotypes potentiellement régulés par QS ; une seconde approche, globale, a consisté à comparer le protéome des souches exprimant l'AHL-lactonase avec celui des souches sauvages afin d'identifier des protéines différentiellement exprimées. Contrairement à d'autres approches globales (*e.g.* banque de promoteurs), la comparaison des profils protéiques entre la souche sauvage et la souche exprimant une lactonase a permis d'avoir directement accès à la fois aux protéines induites et réprimées par le QS.

Chez B518, l'approche ciblée a révélé que l'inactivation des AHLs abolit l'activité pectinase, augmente la production de sidérophores, et réduit la production d'AIA en phase stationnaire mais n'a pas de conséquence sur l'activité cellulase, la mobilité et l'effet phytostimulateur sur le riz en conditions *in vitro*. De plus, d'après les résultats de protéomique, le QS serait notamment impliqué dans la régulation de protéines de transport (OmaA) et de chimiotactisme (ChvE). Dans la continuité de cette étude, des expériences pourraient être entreprises afin d'identifier les déterminants génétiques responsables des phénotypes régulés par QS. Le séquençage du génome de la souche 4B ainsi que les séquences de gènes d'autres souches d'*Azospirillum* déjà disponibles dans les banques de données (*omaA*, *cheY*, *laf*) devraient permettre d'isoler ces gènes chez B518. Des résultats préliminaires (non montrés) ont par exemple permis d'isoler chez B518 une portion d'un gène homologue au gène codant une pectate lyase chez *A. irakense* Kbc1 (Bekri *et al.*, 1999). L'identification des déterminants génétiques permettrait d'envisager des expériences de RT-PCR afin de déterminer si le QS exerce un contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel sur l'expression des gènes identifiés. En effet, chez différentes bactéries telles que *P. aeruginosa* ou *E. carotovora*, des petits ARN régulateurs interviennent dans la régulation du QS en exerçant un contrôle post-transcriptionnel (Bejerano-Sagie & Xavier, 2007). Chez B518, les différents résultats obtenus suggèrent que le QS serait impliqué dans la compétence rhizosphérique, c'est-à-dire la capacité de la bactérie à coloniser la rhizosphère et à survivre dans ce milieu, et dans l'adaptation de la bactérie à la plante hôte. La construction de souches inactivées dans certains gènes dont l'expression est régulée par QS permettrait ainsi de tester cette hypothèse. En effet, si les protéines OmaA et ChvE sont importantes pour l'interaction de certaines souches d'*A. brasilense* avec la plante (Burdman *et al.*, 2001; Van Bastelaere *et al.*, 1999), leur rôle respectif chez *A. lipoferum* B518 reste à déterminer. Si le génome d'*A.*

lipoferum B518 avait été disponible, nous aurions pu réaliser une étude exhaustive du régulon QS, en identifiant la majorité des protéines différentiellement exprimées, et pas uniquement quelques protéines abondantes ; une approche transcriptomique par puces à ADN aurait également pu être menée.

En revanche, chez la souche TVV3, ni l'approche ciblée combinant à la fois l'analyse de certains phénotypes et l'analyse de l'expression des gènes adjacents à *alpR/alpI*, ni l'approche globale par protéomique, n'ont permis de mettre en évidence des fonctions régulées par QS. En effet, dans l'approche globale, peu de protéines différentiellement exprimées ont pu être détectées en comparant les profils protéiques de la souche sauvage et de la souche exprimant une lactonase. Il est vraisemblable que d'autres études visant à identifier des phénotypes régulés par QS aient échoué mais n'aient pas été publiées. Ainsi, pour la souche *P. syringae* pv. *maculicola* 10912-9, bactérie dont les gènes homologues aux gènes de type *luxR/luxI* ont été caractérisés (Elasri *et al.*, 2001), aucun phénotype régulé par QS n'a pu être identifié (d'Angelo-Picard, 2004). La difficulté à identifier des phénotypes régulés par QS peut résulter de conditions expérimentales non favorables à l'expression des phénotypes recherchés. En effet, l'expression de certains phénotypes notamment impliqués dans le métabolisme secondaire ou la production de facteurs de virulence chez des bactéries pathogènes peut dépendre de la température (Byers *et al.*, 2002; McGowan *et al.*, 2005). De plus, le partenaire végétal peut également influencer la régulation de certains gènes ; chez *A. tumefaciens*, la présence de composés végétaux (opines) est nécessaire pour le transfert conjugatif du plasmide Ti, qui est notamment régulé via les gènes *traI* et *traR* (Fuqua & Winans, 1994; Piper & Farrand, 2000; Zhang *et al.*, 1993). D'autres conditions de culture, par exemple en présence de composés végétaux, pourraient donc être utilisées pour la recherche de phénotypes régulés par QS chez TVV3. Cependant, la caractérisation de l'environnement génétique des gènes *alpR/alpI* suggère qu'ils aient été acquis par transfert horizontal de gènes via un phage. L'acquisition récente des gènes *alpR/alpI* dans le génome de TVV3 pourrait donc impliquer l'absence de régulon QS chez cette souche et ainsi expliquer l'ensemble des résultats obtenus précédemment.

Les résultats obtenus dans le cadre de la recherche de phénotypes régulés par QS chez B518 et TVV3 en utilisant deux approches complémentaires, confirment l'existence de plusieurs systèmes QS différents entre les souches d'*A. lipoferum* productrices d'AHLs. L'existence de systèmes QS différents entre plusieurs souches de la même espèce est particulièrement bien illustrée au sein des *Rhizobiaceae*. Ainsi, chez *R. etli* CNPAF512, les systèmes QS *cinR/cinI* et *raiR/raiI* régulent la nodulation, tandis que chez *R. etli* CFN42, le système QS *traR/traI* permet de réguler le transfert de plasmide symbiotique (Daniels *et al.*,

2002; Tun-Garrido *et al.*, 2003). L'expression d'une lactonase dans la souche B510, souche également isolée comme endophyte du riz et produisant le même profil d'AHLs que la souche B518 (Elbeltagy *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2006a), inactive également la production d'AHLs mais n'altère aucun des phénotypes régulés par QS chez B518 (*i.e.* activité pectinase, production de sidérophores, synthèse d'auxines ; résultats non montrés). Ces résultats confortent l'hypothèse de l'existence de systèmes QS spécifiques à chaque souche d'*Azospirillum lipoferum*. Les techniques d'analyse protéomique, ayant été mises au point chez *Azospirillum*, pourraient à nouveau être utilisées pour identifier des fonctions régulées par QS chez B510 et compléter nos résultats. La même approche pourrait aussi être entreprise avec la souche B52, souche également décrite comme endophyte du riz et produisant des AHLs (Vial *et al.*, 2006a).

Les différents résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont également permis d'apporter des informations nouvelles sur les propriétés phytobénéfiques des souches B518 et TVV3. En effet, nous avons développé (en collaboration avec le LSTM de Montpellier) une méthode d'inoculation du riz en conditions *in vitro* qui a permis d'observer de manière reproductible un effet phytostimulateur des souches B518 et TVV3 sur le riz, mais indépendant de la production d'AHLs. La mise en évidence de la production de dérivés indole de type auxine pourrait expliquer l'effet phytostimulateur observé, la production de phytohormones semblant être principalement responsable de l'effet PGPR d'*Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2001). De nombreuses interférences dans la signalisation QS peuvent se produire dans la rhizosphère (*e.g.* dégradation d'AHLs, (d'Angelo-Picard *et al.*, 2005) ; production de molécules végétales analogues aux AHLs, (Teplitski *et al.*, 2000)) ; nos résultats suggèrent donc qu'ils n'altéreront probablement pas l'effet phytostimulateur des souches B518 et TVV3 sur le riz cultivé en conditions naturelles et que ces souches pourraient être utilisées comme inoculum pour stimuler la croissance des plantes. Cependant, des expériences d'inoculation en conditions de sol non stérile doivent être envisagées pour valider cette hypothèse.

Les AHLs peuvent entraîner une réponse systémique de la part de la plante vis-à-vis des pathogènes. Des souches colonisant les racines de la tomate et productrices d'AHLs, telles *Serratia liquefaciens* MG1 et *Pseudomonas putida* IsoF, entraînent l'augmentation de la réponse systémique de la tomate contre le champignon phytopathogène, *Alternaria alternata*. Les AHLs synthétisées par les souches d'*A. lipoferum* pourraient de la même manière protéger la plante de l'attaque de champignons phytopathogènes. De plus, *A. lipoferum* M, souche dont la production de molécules signal de type AHL n'a pas été testée, produit des sidérophores de type catéchol ayant une activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries et

champignons potentiellement phytopathogènes (Shah, 1992). Les sidérophores, produits par B518 et TVV3, pourraient donc aussi exercer une activité antimicrobienne ; des expériences complémentaires pourraient être envisagées pour caractériser la nature de ces composés par des analyses en spectrométrie de masse et pour tester leur activité antimicrobienne. De plus, les 3-oxo-AHLs et leurs produits de dégradation ont des propriétés antibactériennes (Kaufmann *et al.*, 2005). La production de sidérophores et de ce type d'AHLs par les souches B518 et TVV3 pourrait ainsi favoriser la compétitivité de ces souches dans la rhizosphère. En plus de leur activité phytostimulatrice, les souches B518 et TVV3 pourraient ainsi exercer une activité phytoprotectrice vis-à-vis de microorganismes phytopathogènes, propriété rencontrée chez de nombreux *Pseudomonas* PGPR (Raaijmakers & Weller, 2001; Weller *et al.*, 2002) mais encore peu étudiée chez *Azospirillum*.

2. Les bactériophages chez *Azospirillum*

Les différents résultats préliminaires obtenus sur l'étude des phages chez *Azospirillum* (Franche & Elmerich, 1981; Germida, 1984) nous ont conduit à analyser la prévalence des phages au sein du genre *Azospirillum*. Des inductions à la mitomycine C réalisées sur 24 souches d'*Azospirillum* productrices ou non d'AHLs ont révélé que 11 souches appartenant à trois espèces différentes sont capables de produire des particules phagiques. L'étude des phages chez différents modèles bactériens tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Lactococcus lactis* montre que la présence de prophages chez différentes souches appartenant à la même espèce est relativement fréquente (Chopin *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2007). Cependant peu d'études s'intéressent finalement aux bactériophages d'alpha-protéobactéries, si bien que leurs rôles chez les bactéries appartenant à cette classe restent encore mal connus. Nous avons pu mettre en évidence et purifier l'ADN phagique pour six souches d'*A. lipoferum* (4B, 4V_I, 4T, B510, B518, TVV3), quatre souches d'*A. brasilense* (Sp245, Sp7, Cd et Wb1) et une souche d'*A. doebereinae* GSF71. La migration en électrophorèse en champ pulsé et les observations en microscopie électronique révèlent une corrélation entre la taille des génomes phagiques, la taille des particules phagiques et l'espèce bactérienne : la taille des génomes phagiques se situe autour de 10 kb pour les phages issus de l'espèce *lipoferum* et entre 62-65 kb pour ceux de l'espèce *brasilense*. Une étude incluant d'autres souches appartenant à des espèces non testées ou qui étaient sous représentées (*i.e.* *A. irakense*) pourrait être envisagée pour déterminer si la présence de phages tempérés se limite à des souches des espèces *lipoferum*, *brasilense* et *doebereinae*. La corrélation existant entre un type de phage et une espèce pourrait être utile pour caractériser les souches d'*Azospirillum* en complément des analyses

moléculaires classiquement utilisées (e.g. séquençage de l'ADNr16S, galerie API). Chez certaines bactéries pathogènes de l'homme, le nombre d'isolats responsables d'infections et d'épidémies est souvent très important si bien que d'un point de vue épidémiologique, il est souvent difficile de déterminer si deux isolats sont identiques. Chez *Salmonella enteritidis* ou *Listeria monocytogenes*, bactéries pathogènes pour lesquelles de nombreux phages ont été caractérisés, la sensibilité des souches aux infections par différents phages est utilisée pour caractériser de manière plus fine chacune des souches et discriminer les isolats entre eux (Gasanov *et al.*, 2005; Naveteur *et al.*, 1998). De plus, des expériences pourraient être envisagées pour déterminer si les phages mis en évidence chez *Azospirillum* sont capables de réaliser des infections et dans ce cas de caractériser leur spectre d'infection; ceci pourrait permettre d'optimiser l'utilisation de ces phages en tant qu'outils génétiques chez *Azospirillum*.

Le génome du phage isolé de la souche Cd a été séquencé, et constitue le premier génome séquencé d'un bactériophage isolé d'une souche d'*Azospirillum*. La majorité des ORFs identifiés code des protéines hypothétiques, ce qui reflète le peu de connaissances concernant les génomes de phages d'alpha-protéobactéries. Ces ORFs prophagiques constituent un réservoir de nouvelles protéines et peuvent coder des protéines améliorant la fitness de la bactérie hôte ; certains facteurs de virulence sont par exemple codés par des ORFs présents dans des prophages chez certaines bactéries pathogènes (Brüssow & Hendrix, 2002; Canchaya *et al.*, 2003b). La séquence des génomes des autres phages d'*A. brasilense* mis en évidence n'est pas disponible, mais pourrait révéler également de nouvelles protéines, nos résultats de digestion des ADN phagiques par des enzymes de restriction indiquant que les génomes des phages d'*A. brasilense* ne sont probablement pas identiques entre eux.

Plusieurs résultats suggèrent également que les phages isolés d'*A. lipoferum* pourraient être des GTA : (i) les particules phagiques formées sont en effet de petite taille ; (ii) la taille de l'ADN encapsidé est relativement réduite (9-10 kb) ; (iii) les digestions de l'ADN phagique purifié par différentes enzymes de restriction ont toutes produit un « smear » de digestion d'ADN sur gel. Cette hypothèse pourrait notamment expliquer l'échec du séquençage de l'ADN extrait des particules phagiques issues de la souche TVV3. Si tel est le cas, l'identification du génome d'un GTA pourrait être entreprise en identifiant en premier lieu les protéines constituant leur particule phagique par des analyses protéomiques. Ensuite, à l'aide du génome de la souche 4B (souche possédant potentiellement un GTA), il serait donc possible d'identifier les gènes codant ces protéines et de localiser la séquence du génome propre du GTA. Cette étude confirmerait l'existence de GTA chez *A. lipoferum* 4B et permettrait d'étendre l'identification des génomes de GTA aux autres souches d'*A. lipoferum*

produisant des particules phagiques, en particulier si leur séquence est suffisamment conservée entre les différentes souches ; dans ce cas, le génome propre du GTA pourrait aussi être identifié chez TVV3, ce qui permettrait de déterminer s'il correspond aux gènes de prophage adjacents aux gènes *alpR/alpI*. Ce type d'étude permettrait d'apporter des informations complémentaires à nos résultats préliminaires qui suggéraient l'existence d'au moins deux prophages dans le génome de TVV3, un de type GTA et un autre appartenant vraisemblablement à la famille des *Myoviridae* et localisé dans l'environnement des gènes *alpR/alpI*. Pour vérifier cette hypothèse, une approche par protéomique à partir des particules phagiques des GTA pourrait aussi être envisagée, afin d'obtenir les séquences des protéines de structure du GTA et d'en déduire des séquences nucléotidiques correspondantes.

Etant donné la prévalence importante des phages chez *Azospirillum*, il serait intéressant d'étudier les interactions phages-*Azospirillum* dans la rhizosphère. Chez *Ralstonia solanacearum* et *A. brasilense* Sp245, des analyses transcriptomiques ont notamment mis en évidence que des gènes phagiques présents chez ces souches étaient surexprimés en présence de la plante ou d'extraits végétaux (Brown & Allen, 2004; Pothier *et al.*, 2007). Les phages tempérés présents chez *Azospirillum* pourraient donc entrer dans un cycle lytique lorsque la bactérie est au contact de la plante et produire des particules phagiques, qui une fois libérées des cellules bactériennes lysées, pourraient ainsi contribuer à la diversité des bactériophages retrouvés dans l'écotone rhizosphérique (Ashelford *et al.*, 2003). Des travaux réalisés sur des communautés bactériennes en interaction avec des phages dans des environnements aquatiques montrent que l'induction des phages tempérés en conditions naturelles a un impact sur les densités de populations bactériennes (Suttle, 2005; Weinbauer, 2004; Wommack & Colwell, 2000). Chez *Azospirillum*, des études ont montré que la co-inoculation dans le sol de phages induits à partir de la souche Sp7 avec des cellules des souches Cd ou Sp7 ne diminuait pas la viabilité des cellules (Germida, 1986) ; cependant leur rôle dans la dynamique des populations d'*Azospirillum* spp. et des communautés rhizosphériques ne peut être exclu. Les essais d'inoculations de plante par des bactéries PGPR se soldent parfois par des échecs car les effets phytobénéfiques attendus ne sont pas observés ; les phages présents dans la rhizosphère pourraient ainsi infecter les populations de PGPR inoculées et provoquer leur déclin au sein de la communauté rhizosphérique (Stephens *et al.*, 1987). Pour optimiser l'utilisation des PGPR comme inoculant sur des cultures, des études ont été réalisées chez des souches de *P. fluorescens* phytoprotectrices afin d'augmenter la résistance des cellules contre la lyse provoquée par des phages après leur inoculation, notamment en encapsulant les cellules bactériennes dans des billes d'alginate (Smit *et al.*, 1996). En outre, un des avantages de la lysogénie est de conférer à la cellule hôte une immunité la protégeant de l'infection par

d'autres phages (Heinrich *et al.*, 1995; Snyder, 1995). Par conséquent, la présence de phage tempéré chez de nombreuses souches d'*Azospirillum* pourrait ainsi permettre aux cellules de résister à l'infection par d'autres phages et de persister dans la rhizosphère.

3. Contribution des phages à la dynamique des génomes chez *Azospirillum*

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail illustrent l'importance des prophages dans la composition des génomes d'*Azospirillum*, aspect qui jusque là avait peu été pris en considération. De nombreuses études antérieures avaient en revanche souligné la prévalence des plasmides dans l'architecture des génomes d'*Azospirillum*. En effet, les génomes des souches d'*Azospirillum* sont complexes car ils peuvent être constitués de plusieurs chromosomes et de multiples plasmides dont la taille et le nombre varient de manière importante d'une souche à l'autre (Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Franche & Elmerich, 1981; Vial *et al.*, 2006b). Ces plasmides sont notamment impliqués dans la dynamique des génomes d'*Azospirillum*; des modifications du contenu plasmidique de plusieurs souches ont été mis en évidence lors du phénomène de variation de phase (Vial *et al.*, 2006b). Le phage tempéré issu de la souche *A. brasilense* Cd, dont le génome a été séquencé, s'avère être localisé sur un plasmide de 570 kb; une région de 27,3 kb de ce prophage est également présente sur un plasmide de 130 kb chez cette même souche, indiquant un évènement de duplication dans le génome de la souche Cd. Cet évènement de duplication témoigne probablement de réarrangements génomiques impliquant phages et plasmides au sein du génome de la bactérie et démontre aussi leur rôle potentiel dans la plasticité et la diversification de l'architecture des génomes chez *Azospirillum*.

Les plasmides et phages participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs (*e.g.* résistance aux antibiotiques ou production de facteurs de virulence). Les plasmides présents chez *Azospirillum* sont impliqués dans de nombreuses fonctions comme la mobilité, la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire, la dénitrification, ainsi que la synthèse d'AIA et la réduction de l'acétylène qui peuvent être importantes pour les propriétés phytobénéfiques de la bactérie. (Croes & Michiels, 1991; Katzy *et al.*, 1990; Pothier *et al.*, ; Prigent-Combaret *et al.*, 2008; Vanbleu *et al.*, 2004). Cependant la mobilité de ces plasmides par conjugaison a été peu étudiée chez *Azospirillum* (Bally & Givaudan, 1988). Tout comme les plasmides, des gènes présents dans les prophages d'*Azospirillum* et codant notamment de nombreuses protéines hypothétiques, pourraient conférer un avantage sélectif à la bactérie. Le

phénomène lié à l'apparition d'un nouveau phénotype par la bactérie via la présence d'un prophage est appelé conversion lysogénique et est rencontré chez de nombreuses bactéries pathogènes (Brussow *et al.*, 2004). Chez *Azospirillum*, ce phénomène pourrait être illustré avec l'hypothèse que les gènes *alpR/alpI* localisés dans un prophage potentiel aient été acquis via un phage intégratif. Par conséquent, ce dernier serait responsable de l'acquisition par la bactérie d'un nouveau phénotype : la production d'AHLs. Cependant, les conséquences écologiques liées à la présence des gènes *alpR/alpI* chez *A. lipoferum* TVV3 restent à déterminer. Les phages et plasmides, impliqués à la fois dans la plasticité des génomes bactériens et dans les transferts de gènes, ont donc des rôles analogues chez les bactéries. La prévalence des phages et des plasmides chez *Azospirillum* suggère qu'ils pourraient jouer un rôle important dans l'écologie de cette bactérie et dans son adaptabilité à un environnement. Cependant, les données actuelles ne permettent pas d'attribuer un rôle aux différents plasmides et phages chez *Azospirillum*. Le séquençage et l'annotation des génomes d'*A. lipoferum* 4B et *A. brasilense* Sp245 contribueront certainement à la compréhension du rôle des phages et plasmides dans l'écologie et l'adaptation d'*Azospirillum* à son environnement et notamment à la plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ackermann, H.-W. (2006).** 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**, 227–243.
- Alexandre, G., Rohr, R. & Bally, R. (1999).** A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4701-4704.
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. & Baysse, C. (2002).** Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**, 2371-2381.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997).** Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3928-3935.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Arahou, M., Diem, H. G. & Sasson, A. (1998).** Influence of iron depletion on growth and production of catechol siderophores by different *Frankia* strains. *World J Microbiol Biotechnol* **14**, 31-36.
- Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Gorg, A., Eberl, L. & Riedel, K. (2005).** Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. *Syst Appl Microbiol* **28**, 87-114.
- Ashelford, K. E., Norris, S. J., Fry, J. C., Bailey, M. J. & Day, M. J. (2000).** Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4193-4199.
- Ashelford, K. E., Day, M. J. & Fry, J. C. (2003).** Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Appl Environ Microbiol* **69**, 285-289.
- Atkinson, S., Chang, C.-Y., Sockett, R. E., Camara, M. & Williams, P. (2006).** Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol* **188**, 1451-1461.

- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P., Stewart, G. S. & Williams, P. (1992).** *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* **288** 997-1004.
- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A. B., Baldani, J. I. & Doëbereiner, J. (1986).** Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* **90**, 37-40.
- Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T., Balandreau, J., Richard, J. & de Ley, J. (1983).** Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* **29**, 881-887.
- Bally, R. & Givaudan, A. (1988).** Mobilization and transfer of *Azospirillum lipoferum* plasmid by the Tn5-Mob transposon into a plasmid-free *Agrobacterium tumefaciens* strain. *Can J Microbiol* **34**, 1354-1357.
- Barnard, A. M. & Salmond, G. P. (2007).** Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal Bioanal Chem* **387**, 415-423.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. & de la Cruz, F. (1991).** Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**, 75-78.
- Bashan, Y., Holguin, G. & de-Bashan, L. E. (2004).** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* **50**, 521-577.
- Bashan, Y., Singh, M. & Levanony, H. (1989).** Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can J Bot* **67**, 2429-2434.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. & Silverman, M. R. (1993).** Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* **9**, 773-786.
- Baumann, U. (1994).** Crystal structure of the 50 kDa metalloprotease from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol* **242**, 244-251.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Sargent, J. L., Levesque, R. C. & Mattick, J. S. (2002).** Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 3605-3613.
- Beilstein, F. & Dreiseikelmann, B. (2006).** Bacteriophages of freshwater *Brevundimonas vesicularis* isolates. *Res Microbiol* **157**, 213-219.

- Bejerano-Sagie, M. & Xavier, K. B. (2007).** The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **10**, 189-198.
- Bekri, M. A., Desair, J., Keijers, V., Proost, P., Searle-van Leeuwen, M., Vanderleyden, J. & Vande Broek, A. (1999).** *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J Bacteriol* **181**, 2440-2447.
- Beringer, J. F. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Bertani, I. & Venturi, V. (2004).** Regulation of the *N*-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5493-5502.
- Blahá, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M. S. & Moenne-Loccoz, Y. (2006).** Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 455-470.
- Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology* **4**, 343-350.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Papke, R. T., Walsh, D. A., Boudreau, M. E., Nesbo, C. L., Case, R. J. & Doolittle, W. F. (2003).** Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu Rev Genet* **37**, 283-328.
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J., de Vos, W. M. & van der Oost, J. (2003).** The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol* **48**, 287-294.
- Broudy, T. B., Pancholi, V. & Fischetti, V. A. (2001).** Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group a streptococci during coculture with human pharyngeal cells. *Infect Immun* **69**, 1440-1443.
- Brown, D. G. & Allen, C. (2004).** *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Mol Microbiol* **53**, 1641-1660.
- Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D. (2004).** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 560-602.
- Brüssow, H. & Desiere, F. (2001).** Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol Microbiol* **39**, 213-223.

- Brüssow, H. & Hendrix, R. W. (2002).** Phage genomics: small is beautiful. *Cell* **108**, 13-16.
- Burdman, S., Dulguerova, G., Okon, Y. & Jurkevitch, E. (2001).** Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 555-561.
- Burr, T., Barnard, A. M., Corbett, M. J., Pemberton, C. L., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2006).** Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Mol Microbiol* **59**, 113-125.
- Byers, J. T., Lucas, C., Salmond, G. P. & Welch, M. (2002).** Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* **184**, 1163-1171.
- Caballero-Mellado, J., López-Reyes, L. & Bustillos-Cristales, R. (1999).** Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 283-288.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. & Brussow, H. (2003a).** Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**, 417-424.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. & Brussow, H. (2003b).** Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 238-276.
- Canchaya, C., Fournous, G. & Brüssow, H. (2004).** The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* **53**, 9-18.
- Cantero, L., Palacios, J. M., Ruiz-Argueso, T. & Imperial, J. (2006).** Proteomic analysis of quorum sensing in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. *PROTEOMICS* **6 Suppl 1**, S97-106.
- Carrier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y. & Faure, D. (2003).** The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4989-4993.
- Carrier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y. & Faure, D. (2004).** The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the *N*-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 951-957.
- Casjens, S. (2003).** Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far ? *Mol Microbiol* **49**, 277-300.
- Casjens, S. R. (2005).** Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **8**, 451-458.

- Chan, Y. Y. & Chua, K. L. (2005).** The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *J Bacteriol* **187**, 4707-4719.
- Chan, Y. Y., Bian, H. S., Tan, T. M. & other authors (2007).** Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **189**, 4320-4324.
- Chancey, S. T., Wood, D. W. & Pierson, L. S., 3rd (1999).** Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2294-2299.
- Charlton, T. S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2000).** A novel and sensitive method for the quantification of *N*-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ Microbiol* **2**, 530-541.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R. & Chatterjee, A. K. (2003).** GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 1106-1117.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H. & Chatterjee, A. K. (2007).** PsrA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3684-3694.
- Chen, H., Teplitski, M., Robinson, J. B., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. (2003).** Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J Bacteriol* **185**, 5029-5036.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E., & Faure, D. (2006).** GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7460-7464.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L. & Brüßow, H. (2004).** Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* **186**, 3677-3686.
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1974).** *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3672-3676.
- Chin, A. W. T. F., van den Broek, D., de Voer, G., van der Drift, K. M., Tuinman, S., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. & Bloemberg, G. V. (2001).** Phenazine-1-

carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 969-979.

Cho, H. S., Park, S. Y., Ryu, C. M., Kim, J. F., Kim, J. G. & Park, S. H. (2007). Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 14-23.

Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S. D. & Chopin, M. (2001). Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res* **29**, 644-651.

Christie, G. E., Temple, L. M., Bartlett, B. A. & Goodwin, T. S. (2002). Programmed translational frameshift in the bacteriophage P2 FETUD tail gene operon. *J Bacteriol* **184**, 6522-6531.

Croes, C., van Bastelaere, E., DeClercq, E., Eyers, M., Vanderleyden, J. & Michiels, K. (1991). Identification and mapping of loci involved in motility, adsorption to wheat roots, colony morphology, and growth in minimal medium on the *Azospirillum brasilense* Sp7 90-MDa plasmid. *Plasmid* **26**, 83-93.

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K. & Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J Bacteriol* **177**, 5108-5115.

Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N. & Chatterjee, A. K. (2005). ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J Bacteriol* **187**, 4792-4803.

Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H. & Chatterjee, A. K. (2006). *Erwinia carotovora* subspecies produce duplicate variants of ExpR, LuxR homologs that activate *rsmA* transcription but differ in their interactions with *N*-acylhomoserine lactone signals. *J Bacteriol* **188**, 4715-4726.

d'Angelo-Picard, C. (2004). Communication Quorum Sensing : Régulation génique chez *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* et Structuration des populations rhizosphériques. PhD thesis. Université Paris XI Orsay.

- d'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I. & Dessaux, Y. (2005).** Diversity of *N*-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ Microbiol* **7**, 1796-1808.
- Daniels, R., De Vos, D. E., Desair, J. & other authors (2002).** The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Biol Chem* **277**, 462-468.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004).** Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 261-289.
- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H. & other authors (2006).** Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14965-14970.
- Danino, V. E., Wilkinson, A., Edwards, A. & Downie, J. A. (2003).** Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**, 511-525.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999).** RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 2175-2184.
- de Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. & Iglewski, B. H. (2001).** Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1865-1873.
- de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1994).** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386-405.
- Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S. & Venturi, V. (2002).** Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Curr Microbiol* **45**, 250-254.
- Degrassi, G., Devescovi, G., Solis, R., Steindler, L. & Venturi, V. (2007).** *Oryza sativa* rice plants contain molecules that activate different quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone biosensors and are sensitive to the specific AiiA lactonase. *FEMS Microbiol Lett* **269**, 213-220.
- Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A. & other authors (2005).** *N*-hexanoyl-*L*-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability

and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol* **52**, 13-20.

Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O. & Salzberg, S. L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* **27**, 4636-4641.

DeLisa, M. P., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2001a). Quorum signaling via AI-2 communicates the "Metabolic Burden" associated with heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **75**, 439-450.

DeLisa, M. P., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2001b). Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **183**, 2918-2928.

Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**, 2576-2586.

Diggle, S. P., Crusz, S. A. & Camara, M. (2007). Quorum sensing. *Curr Biol* **17**, R907-910.

Dobbelaere, S., A., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D. & other authors (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* **28**, 871-879.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **212**, 155-164.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* **22**, 107-149.

Dobretsov, S., Dahms, H.-U., YiLi, H., Wahl, M. & Qian, P.-Y. (2007). The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 177-188.

Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Xu, J.-L., Zhang, H.-B., Zhang, X.-F. & Zhang, L.-H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**, 813-817.

Dong, Y.-H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J.-L. & Zhang, L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1754-1759.

- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2000).** AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3526-3531.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Xu, J. L. & Zhang, L. H. (2004).** Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* **70**, 954-960.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Soo, H. M., Greenberg, E. P. & Zhang, L. H. (2005a).** The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **56**, 1287-1301.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Xu, J. L., Tan, A. T. & Zhang, L. H. (2005b).** VqsM, a novel AraC-type global regulator of quorum-sensing signalling and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **58**, 552-564.
- Dosselaere, F., Lambrecht, M. & Vanderleyden, J. (2000).** Isolation and sequence analysis of the *trpBA* gene cluster, encoding tryptophan synthase, from *Azospirillum brasilense*. *DNA Seq* **11**, 287-293.
- Dozois, C. M., Daigle, F. & Curtiss, R., 3rd (2003).** Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 247-252.
- Duan, K. & Surette, M. G. (2007).** Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol* **189**, 4827-4836.
- Dubern, J. F., Lugtenberg, B. J. & Bloemberg, G. V. (2006).** The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J Bacteriol* **188**, 2898-2906.
- Dulla, G. & Lindow, S. E. (2008).** Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3082-3087.
- Dunlap, P. V. & Greenberg, E. P. (1985).** Control of *Vibrio fischeri* luminescence gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **164**, 45-50.
- Dunlap, P. V. & Greenberg, E. P. (1988).** Control of *Vibrio fischeri lux* gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit. *J Bacteriol* **170**, 4040-4046.
- Dunlap, P. V. (1999).** Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 5-12.

- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C. & other authors (1996). Involvement of *N*-acyl-*L*-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127-136.
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 17-26.
- Egland, K. A. & Greenberg, E. P. (1999). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* **31**, 1197-1204.
- El Zemrany, H., Cortet, J., Lutz, M. P. & other authors (2006). Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol Biochem* **38**, 1712-1726.
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P. M. & Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1198-1209.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5285-5293.
- Elmerich, C., Quiviger, B., Rosenberg, C., Franche, C., Laurent, P. & Döbereiner, J. (1982). Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum*. *Virology* **122**, 29-37.
- Erickson, D. L., Lines, J. L., Pesci, E. C., Venturi, V. & Storey, D. G. (2004). *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun* **72**, 5638-5645.
- Eskew, D. L., Focht, D. D. & Ting, I. P. (1977). Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl Environ Microbiol* **34**, 582-585.
- Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**, 175-185.

- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997a).** Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **26**, 251-259.
- Flavier, A. B., Ganova-Raeva, L. M., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997b).** Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* **179**, 7089-7097.
- Flavier, A. B., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1998).** An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **28**, 475-486.
- Foster, R. C. (1988).** Microenvironments of soil microorganisms. *Biol Fertil Soils* **6**, 2802-2804.
- Frache, C. & Elmerich, C. (1981).** Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. *Ann Microbiol (Paris)* **132A**, 3-18.
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (2002).** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 685-695.
- Fuqua, W. C. & Winans, S. C. (1994).** A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**, 2796-2806.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**, 3000-3009.
- Gao, M., Chen, H., Eberhard, A., Gronquist, M. R., Robinson, J. B., Connolly, M., Teplitski, M., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. (2007).** Effects of AiiA-mediated quorum quenching in *Sinorhizobium meliloti* on quorum-sensing signals, proteome patterns, and symbiotic interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 843-856.
- Gasnov, U., Hughes, D. & Hansbro, P. M. (2005).** Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 851-875.

- Germida, J. J. (1984).** Spontaneous induction of bacteriophage during growth of *Azospirillum brasilense* in complex media. *Can J Microbiol* **30**, 805-808.
- Germida, J. J. (1986).** Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. *Plant Soil* **90**, 117-128.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571-607. Edited by J. M. Walker: Humana Press.
- Girard, G., van Rij, E. T., Lugtenberg, B. J. J. & Bloemberg, G. V. (2006).** Regulatory roles of *psrA* and *rpoS* in phenazine-1-carboxamide synthesis by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Microbiology* **152**, 43-58.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (1996).** Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**, 6618-6622.
- Glenn, S. A., Gurich, N., Feeney, M. A. & Gonzalez, J. E. (2007).** The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**, 7077-7088.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995).** A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **61**, 793-796.
- Gonzalez, J. E. & Marketon, M. M. (2003).** Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 574-592.
- Gonzalez, J. E. & Keshavan, N. D. (2006).** Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 859-875.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195-202.
- Goryachev, A. B., Toh, D. J., Wee, K. B., Lee, T., Zhang, H. B. & Zhang, L. H. (2005).** Transition to quorum sensing in an *Agrobacterium* population: A stochastic model. *PLoS Comput Biol* **1**, e37.
- Gotz, C., Fekete, A., Gebefuegi, I. & other authors (2007).** Uptake, degradation and chiral discrimination of *N*-acyl-*D/L*-homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1447-1457.

- Gray, E. J. & Smith, D. L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* **37**, 395-412.
- Gray, K. M. & Garey, J. R. (2001).** The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**, 2379-2387.
- Haas, D., Keel, C. & Reimmann, C. (2002).** Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 385-395.
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J. & Greenberg, E. P. (1997).** Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**, 4882-4887.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999).** Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**, 5766-5770.
- Harari, A., Kigel, J. & Okon, Y. (1988).** Involvement of IAA in the Interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant Soil* **110**, 275-282.
- Haseltine, E. L. & Arnold, F. H. (2008).** Implications of rewiring bacterial quorum sensing. *Appl Environ Microbiol* **74**, 437-445.
- He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J. & Fuqua, C. (2003).** Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* **185**, 809-822.
- Heinrich, J., Velleman, M. & Schuster, H. (1995).** The tripartite immunity system of phages P1 and P7. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 121-126.
- Hendrix, R. W. (2003).** Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* **6**, 506-511.
- Hense, B. A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A. & Kreft, J. U. (2007).** Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5**, 230-239.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B. & other authors (2002).** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**, 87-102.
- Heurlier, K., Denervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C. & Haas, D. (2003).** Negative control of quorum sensing by RpoN (sigma54) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 2227-2235.

- Hoang, H. H., Becker, A. & Gonzalez, J. E. (2004).** The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* **186**, 5460-5472.
- Hoang, H. H., Gurich, N. & Gonzalez, J. E. (2008).** Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**, 861-871.
- Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R. & other authors (1999).** Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **33**, 1254-1266.
- Horswill, A. R., Stoodley, P., Stewart, P. S. & Parsek, M. R. (2007).** The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal Bioanal Chem* **387**, 371-380.
- Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Garg, R. P., Denny, T. P. & Schell, M. A. (1998).** Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* **180**, 2736-2743.
- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H. & Leadbetter, J. R. (2003).** Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5941-5949.
- Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M. & Leadbetter, J. R. (2006).** Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1190-1197.
- Hussain, M. B., Zhang, H. B., Xu, J. L., Liu, Q., Jiang, Z. & Zhang, L. H. (2008).** The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zoeae*. *J Bacteriol* **190**, 1045-1053.
- Hynes, M. F. & McGregor, N. F. (1990).** Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* **4**, 567-574.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. & Bally, R. (1999).** Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can J Microbiol* **45**, 339-342.
- Jaeger, C. H., 3rd, Lindow, S. E., Miller, W., Clark, E. & Firestone, M. K. (1999).** Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2685-2690.

- Jafra, S. & van der Wolf, J. M. (2004).** Fast screening method for detection of acyl-HSL-degrading soil isolates. *J Microbiol Methods* **57**, 415-420.
- Jafra, S., Przynsowa, J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P. & Van der Wolf, J. M. (2006).** Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading *N*-acyl-homoserine lactone. *Can J Microbiol* **52**, 1006-1015.
- Johansson, J. & Cossart, P. (2003).** RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **11**, 280-285.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J. & other authors (1993).** The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Embo J* **12**, 2477-2482.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B. & other authors (2004).** Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 831-841.
- Kabir, M., Faure, D., Heulin, T., Achouak, W. & Bally, R. (1995).** *Azospirillum* populations in soils infested by a parasitic weed (*Striga*) under *Sorghum* cultivation in Mali, West Africa. *Eur J Soil Biol* **32**, 157-163.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N. & Lugtenberg, B. (2006).** Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 250-256.
- Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P. A. & Kaiser, P. (1989).** *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol* **140**, 679-693.
- Kang, B. R., Lee, J. H., Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, J. S., Cho, B. H. & Kim, Y. C. (2004).** Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Can J Microbiol* **50**, 935-941.
- Kaplan, H. B. & Greenberg, E. P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**, 1210-1214.
- Katzy, E. I., Iosipenko, A. D., Egorenkov, D. A., Zhuravleva, E. A., Panasencko, V. I. & Ignatov, V. V. (1990).** Involvement of *Azospirillum brasilense* plasmid DNA in the production of indole acetic acid. *FEMS Microbiol Lett* **60**, 1-4.

- Kaufmann, G. F., Sartorio, R., Lee, S. H. & other authors (2005).** Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 309-314.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. & Haas, D. (2006).** Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 6026-6033.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004).** The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *PROTEOMICS* **4**, 3177-3186.
- Keshavan, N. D., Chowdhary, P. K., Haines, D. C. & Gonzalez, J. E. (2005).** L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**, 8427-8436.
- Kim, J., Kang, Y., Choi, O. & other authors (2007).** Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol* **64**, 165-179.
- Kjelleberg, S., Steinberg, P. D., Givskov, M., Manefield, M. & de Nys, R. (1997).** Do marine products interfere with procaryotic AHL regulatory systems. *Aquat Microbiol Ecol* **13**, 85-93.
- Kolter, R. & Greenberg, E. P. (2006).** Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**, 300-302.
- Koronakis, V., Stanley, P., Koronakis, E. & Hughes, C. (1992).** The HlyB/HlyD-dependent secretion of toxins by gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Immunol* **5**, 45-53.
- Koutsoudis, M. D., Tsalas, D., Minogue, T. D. & von Bodman, S. B. (2006).** Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5983-5988.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Krick, A., Kehraus, S., Eberl, L., Riedel, K., Anke, H., Kaesler, I., Graeber, I., Szewzyk, U. & Konig, G. M. (2007).** A marine *Mesorhizobium* sp. produces structurally novel long-chain N-acyl-L-homoserine lactones. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3587-3594.
- Kukolj, G., Toliás, P. P. & DuBow, M. S. (1989).** Purification and characterization of the Ner repressor of bacteriophage Mu. *FEBS Lett* **244**, 369-375.

- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. & other authors (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225-1240.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. & Pelletier, J. (2005).** The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5174-5179.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. & Pelletier, J. (2006).** Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol* **188**, 1184-1187.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. & Korostoff, J. (1999).** The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* **7**, 356-361.
- Lamont, I. L. & Martin, L. W. (2003).** Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 833-842.
- Lang, A. S. & Beatty, J. T. (2007).** Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **15**, 54-62.
- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Lazdunski, A. & Williams, P. (1995).** Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**, 333-343.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-1146.
- Latour, X., Diallo, S., Chevalier, S., Morin, D., Smadja, B., Burini, J. F., Haras, D. & Orange, N. (2007).** Thermoregulation of *N*-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4078-4081.
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. & Williams, P. (2000).** The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**, 2469-2480.

- Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. (2002).** Imbroglions of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J Bacteriol* **184**, 4891-4905.
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000).** Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6926.
- Lee, S. J., Park, S.-Y., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T. & Lee, J.-K. (2002).** Genes encoding the *N*-Acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3919-3924.
- Levin, D. B. & DuBow, M. S. (1989).** Regulation of repressor and early gene expression in Mu-like transposable bacteriophage D108. *Mol Gen Genet* **217**, 392-400.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. (1999).** Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**, 748-756.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. & Zhang, L. H. (2003).** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**, 849-860.
- Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998).** *N*-Acyl-*L*-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384-6388.
- Lithgow, J. K., Danino, V. E., Jones, J. & Downie, J. A. (2001).** Analysis of *N*-acyl homoserine-lactone quorum-sensing molecules made by different strains and biovars of *Rhizobium leguminosarum* containing different symbiotic plasmids. *Plant Soil* **232**, 3-12.
- Liu, X., Bimerew, M., Ma, Y., Muller, H., Ovadis, M., Eberl, L., Berg, G. & Chernin, L. (2007).** Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiol Lett* **270**, 299-305.
- Lohr, J. E., Chen, F. & Hill, R. T. (2005).** Genomic analysis of bacteriophage PhiJL001: insights into its interaction with a sponge-associated alpha-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1598-1609.
- Long, S. R. (1996).** *Rhizobium* symbiosis: *Nod* factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.
- Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J. & Goebel, W. (1996).** Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 5422-5430.

- Lupp, C. & Ruby, E. G. (2004).** *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: comparative study of two signal synthases. *J Bacteriol* **186**, 3873-3881.
- Maddula, V. S., Zhang, Z., Pierson, E. A. & Pierson, L. S., 3rd (2006).** Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84. *Microb Ecol* **52**, 289-301.
- Mae, A., Montesano, M., Koiv, V. & Palva, E. T. (2001).** Transgenic plants producing the bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1035-1042.
- Malhotra, M. & Srivastava, S. (2006).** Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for indoleacetic acid over-expression. *Can J Microbiol* **52**, 1078-1084.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S. A., de Nys, R. & Kjelleberg, S. (2000).** Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2079-2084.
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Givskov, M. (2002).** Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**, 1119-1127.
- Manefield, M. & Whiteley, A. S. (2007).** Acylated homoserine lactones in the environment: chameleons of bioactivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1235-1240.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F. & other authors (2005).** CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**, D192-D196.
- Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A. & Gonzalez, J. E. (2002).** Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* **184**, 5686-5695.
- Marketon, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A. & Gonzalez, J. E. (2003).** Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **185**, 325-331.
- Martin-Didonet, C. C., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Kleina, M., Rego, F. G., Rigo, L. U., Yates, M. G. & Pedrosa, F. O. (2000).** Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J Bacteriol* **182**, 4113-4116.
- Marutani, M., Taguchi, F., Ogawa, Y., Hossain, M. M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Ichinose, Y. (2008).** Gac two-component system in *Pseudomonas syringae*

pv. *tabaci* is required for virulence but not for hypersensitive reaction. *Mol Genet Genomics* **279**, 313-322.

Mason, V. P., Markx, G. H., Thompson, I. P., Andrews, J. S. & Manefield, M. (2005). Colonial architecture in mixed species assemblages affects AHL mediated gene expression. *FEMS Microbiol Lett* **244**, 121-127.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1444-1449.

McAnulla, C., Edwards, A., Sanchez-Contreras, M., Sawers, R. G. & Downie, J. A. (2007). Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology* **153**, 2074-2082.

McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L. & other authors (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**, 3703-3711.

McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P. F., Bycroft, B., Stewart, G. S., Williams, P. & Salmond, G. P. (1995). Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology* **141**, 541-550.

McGowan, S. J., Barnard, A. M., Bosgelmez, G. & other authors (2005). Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol* **55**, 526-545.

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

McKenney, D., Brown, K. E. & Allison, D. G. (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J Bacteriol* **177**, 6989-6992.

Medina-Martinez, M. S., Uyttendaele, M., Demolder, V. & Debevere, J. (2006). Effect of temperature and glucose concentration on the *N*-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiol* **23**, 534-540.

- Miche, L. & Balandreau, J. (2001).** Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3046-3052.
- Michiels, K., De Troch, P., Onyeocha, I., Van Gool, A., Elmerich, C. & Vanderleyden, J. (1989).** Plasmid localization and mapping of two *Azospirillum brasilense* loci that affect exopolysaccharide synthesis. *Plasmid* **21**, 142-146.
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M. & Williams, P. (2001).** The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. *J Bacteriol* **183**, 3537-3547.
- Minogue, T. D., Carlier, A. L., Koutsoudis, M. D. & von Bodman, S. B. (2005).** The cell density-dependent expression of stewartan exopolysaccharide in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* is a function of EsaR-mediated repression of the *rcaA* gene. *Mol Microbiol* **56**, 189-203.
- Moens, S., Michiels, K., Keijers, V., Van Leuven, F. & Vanderleyden, J. (1995).** Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *lafI*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Bacteriol* **177**, 5419-5426.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B. & Defago, G. (2003).** Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 71-81.
- Morohoshi, T., Nakamura, Y., Yamazaki, G., Ishida, A., Kato, N. & Ikeda, T. (2007).** The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces *N*-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J Bacteriol* **189**, 8333-8338.
- Nasser, W. & Reverchon, S. (2007).** New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387**, 381-390.
- Naveteur, J., Godefroy, O., Sequeira, H., Laconcha, I., Lopez-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I. & Garaizar, J. (1998).** Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int J Food Microbiol* **40**, 27-34.
- Nelson, L. M. & Knowles, R. (1978).** Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. *Can J Microbiol* **24**, 1395-1403.

- Newman, E. B. & Lin, R. (1995).** Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**, 747-775.
- Newton, J. A. & Fray, R. G. (2004).** Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* **6**, 213-224.
- Niu, C., Graves, J. D., Mokuolu, F. O., Gilbert, S. E. & Gilbert, E. S. (2005).** Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J Microbiol Methods* **62**, 129-132.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6424-6428.
- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**, 1277-1287.
- Oger, P. & Farrand, S. K. (2001).** Co-evolution of the agrocinopine opines and the agrocinopine-mediated control of TraR, the quorum-sensing activator of the Ti plasmid conjugation system. *Mol Microbiol* **41**, 1173-1185.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K. & Hayashi, T. (2001).** Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors ? *Trends Microbiol* **9**, 481-485.
- Okon, Y. (1994).** *Azospirillum*/plant associations. *CRC Press, Boca Raton*.
- Okon, Y. & Itzigsohn, R. (1995).** The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnol Adv* **13**, 415-424.
- Okon, Y. & Vanderleyden, J. (1997).** Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* **63**, 366-370.
- Ona, O., Van Impe, J., Prinsen, E. & Vanderleyden, J. (2005).** Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 125-132.
- Oresnik, I. J., Twelker, S. & Hynes, M. F. (1999).** Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2833-2840.
- Ortori, C. A., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P. & Barrett, D. A. (2007).** Comprehensive profiling of *N*-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia*

pseudotuberculosis using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **387**, 497-511.

Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lulis, A. J., Greenberg, E. P. & Zabner, J. (2005). Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol Lett* **253**, 29-37.

Pan, J., Huang, T., Yao, F., Huang, Z., Powell, C. A., Qiu, S. & Guan, X. (2008). Expression and characterization of *aiiA* gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiol Res* **In press**.

Parent, M. E., Snyder, C. E., Kopp, N. D. & Velegol, D. (2008). Localized quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *Colloids Surf B Biointerfaces* **62**, 180-187.

Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y. & Lee, J. K. (2003). AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**, 1541-1550.

Park, S. Y., Kang, H. O., Jang, H. S., Lee, J. K., Koo, B. T. & Yum, D. Y. (2005). Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2632-2641.

Park, S.-Y., Hwang, B.-J., Shin, M.-H., Kim, J.-A., Kim, H.-K. & Lee, J.-K. (2006). *N*-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol Lett* **261**, 102-108.

Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4360-4365.

Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27-33.

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127-1130.

Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.

Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M. & other authors (2003). Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**, 171-182.

- Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. & Walker, G. C. (2002).** A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 5067-5076.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999).** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234.
- Pessi, G. & Haas, D. (2000).** Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 6940-6949.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001).** The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 6676-6683.
- Pierson, L. S., 3rd, Keppenne, V. D. & Wood, D. W. (1994).** Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* **176**, 3966-3974.
- Pierson, L. S., 3rd, Wood, D. W. & Pierson, E. A. (1998).** Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 207-225.
- Piper, K. R. & Farrand, S. K. (2000).** Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J Bacteriol* **182**, 1080-1088.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. & Palva, E. T. (1993).** A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* **12**, 2467-2476.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. & Sa, T. (2007).** Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. *Res Microbiol* **158**, 287-294.
- Pothier, J. F., Prigent-Combaret, C., Haurat, J., Moënne-Loccoz, Y. & Wisniewski-Dyé, F. (2008).** Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene *nirK* in the wheat-associated plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Mol Plant Microbe Interact* **In press**.

- Pothier, J. F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëgne-Loccoz, Y. & Prigent-Combaret, C. (2007).** Promoter trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* **153**, 3608-3622.
- Prasad, C. (1995).** Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides* **16**, 151-164.
- Prigent-Combaret, C., Blaha, D., Pothier, J. F., Vial, L., Poirier, M. A., Wisniewski-Dyé, F. & Moëgne-Loccoz, Y. (2008).** Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **In press**.
- Purevdorj, B., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2002).** Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4457-4464.
- Quiñones, B., Dulla, G. & Lindow, S. E. (2005).** Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 682-693.
- Raaijmakers, J. M. & Weller, D. M. (2001).** Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2545-2554.
- Rabilloud, T. (1999).** Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297-305.
- Rampioni, G., Bertani, I., Zennaro, E., Polticelli, F., Venturi, V. & Leoni, L. (2006).** The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol* **188**, 815-819.
- Rampioni, G., Polticelli, F., Bertani, I., Righetti, K., Venturi, V., Zennaro, E. & Leoni, L. (2007).** The *Pseudomonas* quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins. *J Bacteriol* **189**, 1922-1930.
- Ramsay, J. P., Sullivan, J. T., Stuart, G. S., Lamont, I. L. & Ronson, C. W. (2006).** Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol Microbiol* **62**, 723-734.

- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L. & Givskov, M. (2005a). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* **187**, 1799-1814.
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T. & other authors (2005b). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**, 1325-1340.
- Rasmussen, T. B. & Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* **152**, 895-904.
- Redfield, R. J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing ? *Trends Microbiol* **10**, 365-370.
- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L. & other authors (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**, 923-932.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y. & Faure, D. (2008). A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ Microbiol* **10**, 560-570.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O. & other authors (2001). *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147**, 3249-3262.
- Riedel, K., Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Gorg, A., Lottspeich, F. & Eberl, L. (2003). Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis* **24**, 740-750.
- Riedel, K., Carranza, P., Gehrig, P., Potthast, F. & Eberl, L. (2006). Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: setting up a 2-DE reference map. *PROTEOMICS* **6**, 207-216.
- Roche, D. M., Byers, J. T., Smith, D. S., Glansdorp, F. G., Spring, D. R. & Welch, M. (2004). Communications blackout ? Do *N*-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing ? *Microbiology* **150**, 2023-2028.
- Rohwer, F., Segall, A., Steward, G., Seguritan, V., Breitbart, M., Wolven, F. & Azam, F. (2000). The complete genomic sequence of the marine phage Roseophage SIO1 shares homology with non-marine phages. *Limnol Oceanogr* **45**, 408-418.

- Romero, D., Brom, S., Martinez-Salazar, J., Girard, M. L., Palacios, R. & Dávila, G. (1991). Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J Bacteriol* **173**, 2435-2441.
- Romero, M., Diggle, S. P., Heeb, S., Camara, M. & Otero, A. (2008). Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett* **280**, 73-80.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)* **16**, 944-945.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sanchez-Contreras, M., Bauer, W. D., Gao, M., Robinson, J. B. & Allan Downie, J. (2007). Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1149-1163.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9505-9509.
- Schaefer, A. L., Taylor, T. A., Beatty, J. T. & Greenberg, E. P. (2002). Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J Bacteriol* **184**, 6515-6521.
- Schnabel, E. L. & Jones, A. L. (2001). Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 59-64.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S. & other authors (2006). Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* **29**, 909-918.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066-2079.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973-985.

- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
- Shah, S., Karkhanis, V. & Desai, A. (1992).** Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Curr Microbiol* **25**, 347-351.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L. & Farrand, S. K. (1997).** Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6036-6041.
- Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P. & Williams, S. C. (2005).** Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 935-947.
- Silander, O. K., Weinreich, D. M., Wright, K. M., O'Keefe, K. J., Rang, C. U., Turner, P. E. & Chao, L. (2005).** Widespread genetic exchange among terrestrial bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 19009-19014.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000).** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-764.
- Sjoblom, S., Brader, G., Koch, G. & Palva, E. T. (2006).** Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Microbiol* **60**, 1474-1489.
- Slettan, A., Gebhardt, K., Kristiansen, E., Birkeland, N. K. & Lindqvist, B. H. (1992).** *Escherichia coli* K-12 and B contain functional bacteriophage P2 *ogr* genes. *J Bacteriol* **174**, 4094-4100.
- Smit, E., Wolters, A. C., Lee, H., Trevors, J. T. & van Elsas, J. D. (1996).** Interactions between a genetically marked *Pseudomonas fluorescens* strain and bacteriophage Φ R2f in soil: Effects of nutrients, alginate encapsulation, and the wheat rhizosphere. *Microb Ecol* **31**, 125-140.
- Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2002).** The *Pseudomonas autoinducer* *N*-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J Immunol* **169**, 2636-2642.
- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003).** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.

- Smith, S. E. & Read, D. J. (1997).** Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. *Academic Press, San Diego, CA, USA*, 605 p.
- Snyder, L. (1995).** Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents ? *Mol Microbiol* **15**, 415-420.
- Stanley, P., Koronakis, V. & Hughes, C. (1998).** Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 309-333.
- Stanton, T. B. (2007).** Prophage-like gene transfer agents—Novel mechanisms of gene exchange for *Methanococcus*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*, and *Rhodobacter* species. *Anaerobe* **13**, 43-49.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R. & other authors (2001).** Visualization of *N*-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5761-5770.
- Steidle, A., Allesen-Holm, M., Riedel, K., Berg, G., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2002).** Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl Environ Microbiol* **68**, 6371-6382.
- Stephens, P. M., O'Sullivan, M. & O'Gara, F. (1987).** Effect of bacteriophage on colonization of sugarbeet roots by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1164-1167.
- Stevens, A. M. & Greenberg, E. P. (1997).** Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* **179**, 557-562.
- Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J. M. & Poole, K. (1998).** Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **166**, 341-345.
- Stoltz, D. A., Ozer, E. A., Ng, C. J. & other authors (2007).** Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, 852-860.
- Surette, M. G. & Bassler, B. L. (1999).** Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **31**, 585-595.
- Suttle, C. A. (2005).** Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361.

- Swift, S., Karlyshev, A. V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Williams, P., Macintyre, S. & Stewart, G. S. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* **179**, 5271-5281.
- Swift, S., Lynch, M. J., Fish, L., Kirke, D. F., Tomas, J. M., Stewart, G. S. & Williams, P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **67**, 5192-5199.
- Taga, M. E., Semmelhack, J. L. & Bassler, B. L. (2001). The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **42**, 777-793.
- Taga, M. E. & Bassler, B. L. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**, 14549-14554.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R. & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* **24**, 967-980.
- Teiber, J. F., Horke, S., Haines, D. C., Chowdhary, P. K., Xiao, J., Kramer, G. L., Haley, R. W. & Draganov, D. I. (2008). Dominant role of paraoxonases in the inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* In Press.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42.
- Teplitski, M., Robinson, J. B. & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 637-648.
- Teplitski, M., Chen, H., Rajamani, S., Gao, M., Merighi, M., Sayre, R. T., Robinson, J. B., Rolfe, B. G. & Bauer, W. D. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds

that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *Plant Physiol* **134**, 137-146.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J. & other authors (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13950-13955.

Tien, T. M., Gaskins, M. H. & Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* **37**, 1016-1024.

Trân Vân, V., Berge, O., Faure, D., Bally, R., Hebbar, P. & Heulin, T. (1997). A simple method for the isolation of *Azospirillum* strains associated with the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* **43**, 486-490.

Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V. & Brom, S. (2003). Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**, 1681-1692.

Ulrich, R. L. (2004). Quorum quenching: Enzymatic disruption of *N*-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6173-6180.

Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D. & Dessaux, Y. (2003). Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**, 1981-1989.

Uroz, S., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P., Oger, P. & Dessaux, Y. (2005). *N*-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology* **151**, 3313-3322.

Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M. T., Faure, D. & Dessaux, Y. (2008). A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1357-1366.

Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P. & Vanderleyden, J. (1999). Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Mol Microbiol* **32**, 703-714.

- van Delden, C., Comte, R. & Bally, A. M. (2001).** Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 5376-5384.
- Van Houdt, R., Moons, P., Hueso Buj, M. & Michiels, C. W. (2006).** *N*-acyl-L-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *J Bacteriol* **188**, 4570-4572.
- Van, V. T. (1994).** *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov., une protéobactérie fixatrice d'azote de la rhizosphère du riz isolée d'un sol sulfaté acide : taxonomie et effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement du riz, pp. 360. PhD thesis. Université Nancy I.
- Vanbleu, E., Marchal, K., Lambrecht, M., Mathys, J. & Vanderleyden, J. (2004).** Annotation of the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* reveals its role in determining the outer surface composition. *FEMS Microbiol Lett* **232**, 165-172.
- Ventura, M., Zomer, A., Canchaya, C. & other authors (2007).** Comparative analyses of prophage-like elements present in two *Lactococcus lactis* strains. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7771-7780.
- Venturi, V. (2006).** Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 274-291.
- Veselova, M., Kholmeckaya, M., Klein, S. & other authors (2003).** Production of *N*-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia microbiologica* **48**, 794-798.
- Vial, L. (2005).** Modification de l'architecture génomique lors de la variation de phase et mise en évidence d'un phénomène de communication cellulaire chez la bactérie *Azospirillum*, pp. 199. PhD thesis. Université Claude Bernard-Lyon1.
- Vial, L., Cuny, C., Gluchoff-Fiasson, K., Comte, G., Oger, P. M., Faure, D., Dessaux, Y., Bally, R. & Wisniewski-Dyé, F. (2006a).** *N*-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. *FEMS Microbiol Ecol* **58**, 155-168.
- Vial, L., Lavire, C., Mavingui, P., Blaha, D., Haurat, J., Moënné-Loccoz, Y., Bally, R. & Wisniewski-Dyé, F. (2006b).** Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*. *J Bacteriol* **188**, 5364-5373.
- Vieille, C. & Elmerich, C. (1990).** Characterization of two *Azospirillum brasilense* Sp7 plasmid genes homologous to *Rhizobium meliloti* nodPQ. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 389-400.

- von Bodman, S. B., Majerczak, D. R. & Coplin, D. L. (1998). A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7687-7692.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 4372-4380.
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I. & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**, 957-970.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**, 2080-2095.
- Wagner, V. E., Frelinger, J. G., Barth, R. K. & Iglewski, B. H. (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* **14**, 55-58.
- Waldor, M. K. & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Deziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R. & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* **134**, 320-331.
- Wang, L.-H., Weng, L.-X., Dong, Y.-H. & Zhang, L.-H. (2004a). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* **279**, 13645-13651.
- Wang, H., Zhong, Z., Cai, T., Li, S. & Zhu, J. (2004b). Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Arch Microbiol* **182**, 520-525.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B. & Churchill, M. E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* **9**, 685-694.

- Wei, H.-L. & Zhang, L.-Q. (2006).** Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**, 267-280.
- Wei, J.-R., Tsai, Y.-H., Horng, Y.-T., Soo, P.-C., Hsieh, S.-C., Hsueh, P.-R., Horng, J.-T., Williams, P. & Lai, H.-C. (2006).** A mobile quorum-sensing system in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **188**, 1518-1525.
- Weinbauer, M. G. (2004).** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 127-181.
- Weinbauer, M. G. & Rassoulzadegan, F. (2004).** Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol* **6**, 1-11.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. & Thomashow, L. S. (2002).** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 309-348.
- Whitby, P. W., VanWagoner, T. M., Taylor, A. A., Seale, T. W., Morton, D. J., LiPuma, J. J. & Stull, T. L. (2006).** Identification of an RTX determinant of *Burkholderia cenocepacia* J2315 by subtractive hybridization. *J Med Microbiol* **55**, 11-21.
- White, C. E. & Winans, S. C. (2005).** Identification of amino acid residues of the *Agrobacterium tumefaciens* quorum-sensing regulator TraR that are critical for positive control of transcription. *Mol Microbiol* **55**, 1473-1486.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. & Salmond, G. P. C. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904-13909.
- Whiteley, M. & Greenberg, E. P. (2001).** Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* **183**, 5529-5534.
- Wilhelm, S. W. & Suttle, C. A. (1999).** Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* **49**, 781-788.
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dyé, F., Lithgow, J. K. & Downie, J. A. (2002).** N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* **184**, 4510-4519.
- Williams, P. (2007).** Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 3923-3938.

- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C. & Camara, M. (2007).** Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1119-1134.
- Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A. & other authors (1995).** Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9427-9431.
- Wisniewski, J. P. & Rogowsky, P. M. (2004).** Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (Vpp1) marks partial aleurone cell fate in cereal endosperm development. *Plant Mol Biol* **56**, 325-337.
- Wommack, K. E. & Colwell, R. R. (2000).** Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 69-114.
- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. & Pierson, L. S., 3rd (1997).** *N*-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol* **179**, 7663-7670.
- Wopperer, J., Cardona, S. T., Huber, B., Jacobi, C. A., Valvano, M. A. & Eberl, L. (2006).** A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1579-1587.
- Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O. & other authors (2005).** Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **309**, 774-777.
- Xavier, K. B. & Bassler, B. L. (2005a).** Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* **437**, 750-753.
- Xavier, K. B. & Bassler, B. L. (2005b).** Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 238-248.
- Xie, B., Xu, K., Zhao, H. X. & Chen, S. F. (2005).** Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **248**, 57-63.
- Yan, A., Huang, X., Liu, H., Dong, D., Zhang, D., Zhang, X. & Xu, Y. (2007).** An *rhl*-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. *Microbiology* **153**, 16-28.

- Yang, F., Wang, L. H., Wang, J., Dong, Y. H., Hu, J. Y. & Zhang, L. H. (2005).** Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett* **579**, 3713-3717.
- Yang, W.-W., Han, J.-I. & Leadbetter, J. (2006).** Utilization of homoserine lactone as a sole source of carbon and energy by soil *Arthrobacter* and *Burkholderia* species. *Arch Microbiol* **185**, 47-54.
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M. A., Dickerson, T. J., Brogan, A. P., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (2006).** Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J Mol Biol* **355**, 262-273.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C. & other authors (2002).** *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**, 5635-5646.
- Yuan, Z. C., Edlind, M. P., Liu, P. & other authors (2007).** The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11790-11795.
- Zdobnov, E. M. & Apweiler, R. (2001).** InterProScan-an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**, 847-848.
- Zhang, H.-B., Wang, L.-H. & Zhang, L.-H. (2002).** Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4638-4643.
- Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A. & Tate, M. E. (1993).** *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* **362**, 446-448.
- Zhang, L. H. (2003).** Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* **8**, 238-244.
- Zhang, Z. & Pierson, L. S., III (2001).** A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4305-4315.
- Zhou, H., Yao, F., Roberts, D. P. & Lessie, T. G. (2003).** AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. *Curr Microbiol* **47**, 174-179.

Zhu, J. & Winans, S. C. (1999). Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4832-4837.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture
Milieu NFB

- Solution majeure (autoclaver) :

Malate de sodium $C_4H_4O_5Na_2$	5 g
Eau déminéralisée qsp	933 mL
Ajuster à pH 7	

- Pour milieu solide Agar
- 15 g

- Solution de sels (autoclaver) :

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,8 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,104 g
NaCl	0,4 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,008 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,028 g
Eau déminéralisée qsp	400 mL

- Solution de phosphates (autoclaver) :

KH_2PO_4	4 g
K_2HPO_4	6 g
Eau déminéralisée qsp	100 mL

- Solution de fer-EDTA (autoclaver) :

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,631 g
EDTA	0,592 g
Eau déminéralisée qsp	50 mL

- Solution de biotine (filtrer sur 0,22 μm , Millipore) :

Biotine	0,05 g
Ethanol absolu qsp	50 mL

Pour l'utilisation, ajouter au 933 ml de la solution majeure :

- 50 mL de solution de sels,
- 15 mL de solution de phosphates
- 1 mL de solution de fer-EDTA
- 1 mL de solution de biotine

(d'après Nelson & Knowles, 1978).

Milieu LBm (Luria-Bertani modifié)

	Bacto-tryptone	10 g
	Extrait de levure	5 g
	NaCl	5 g
	Eau déminéralisée qsp	1 l
Pour milieu solide	Agar	15 g

Milieu AB**Sels du milieu AB [20x]** *stériliser par autoclavage*

NH ₄ Cl20 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O6 g
KCl3 g
CaCl ₂200 mg
FeSO ₄ , 7H ₂ O50 mg
H ₂ O distilléeq.s.p. 1 litre

Tampon du milieu AB [20x] *stériliser par autoclavage*

K ₂ HPO ₄60 g
NaH ₂ PO ₄23 g
H ₂ O distilléeq.s.p. 1 litre

Source de carbone : Malate *stériliser par autoclavage*

Malate1 g
H ₂ O distillée100 mL

Solution de biotine *filtrer sur 0,22 µM*

Biotine100 mg
H ₂ O distillée100 mL

Préparation du milieu pour 500 ml :

A 425 mL d'eau distillée stérile, ajouter :

- * 25 mL de sels du milieu AB [20x]
- * 25 mL de tampon du milieu AB [20x]
- * 25 mL de la solution source de carbone
- * 500 µL de biotine.

(d'après Chilton *et al.*, 1974).

Annexe 2 : Extraction des ARNs

Toutes les solutions utilisées lors de l'extraction ont subi un traitement au pyrocarbonate de diéthyle (DEPC).

Après décongélation des culots bactériens, 400 μ L de solution de resuspension et 60 μ L d'EDTA 0,5 M ont été ajoutés et le mélange a été introduit dans un tube de 1.5 mL contenant 0.4 g de billes de verres et 500 μ L de phénol acide pH 4.5 (MP Biomedicals, Illkirch, France). Afin de libérer le contenu des cellules bactériennes, les tubes ont subi deux traitements de 1 min dans le vibro-broyeur (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) réglé sur la puissance maximale, traitements séparés par un refroidissement de 2 min dans la glace. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C a été réalisée permettant ainsi de récupérer les acides nucléiques dans la phase aqueuse. Les étapes suivantes ont ensuite été réalisées : (i) ajout de 1 mL du réactif Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) et incubation à température ambiante pendant 5 min ; (ii) ajout de 100 μ L d'un mélange chloroforme / alcool isoamylique 24/1 et incubation à température ambiante pendant 3 min ; (iii) centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C ; (iv) récupération de la phase aqueuse contenant les ARNs ; (v) ajout de 200 μ L d'un mélange chloroforme / alcool isoamylique 24/1 et incubation à température ambiante pendant 3 min ; (vi) centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C ; (vii) récupération de la phase aqueuse ; (viii) ajout de 500 μ L d'isopropanol, puis incubation à -20°C pendant 15 min ; (ix) centrifugation à 13000 rpm pendant 15 min à 4°C, élimination du surnageant et lavage du culot avec 1 mL d'éthanol 70%. Les culots ont été séchés au Speed-vac et ont été resuspendus dans 50 μ L d'eau ultra-pure, via une incubation à 37°C pendant 15min puis stockés à -80°C.

Rôle du quorum-sensing et prévalence des bactériophages chez la bactérie phyto-stimulatrice *Azospirillum*

RESUME :

Le but de ce travail était d'identifier les fonctions régulées par quorum-sensing (QS) chez la bactérie phyto-stimulatrice *Azospirillum*. Les effets phyto-bénéfiques *in vitro* des souches B518 et TVV3 (isolées du riz) ne sont pas altérées par l'inactivation des molécules signal impliquées dans le QS. La combinaison d'une approche ciblée et d'une approche globale par protéomique montre que le QS régule des fonctions liées à l'adaptation à la plante, notamment à la colonisation racinaire chez B518. Chez TVV3, aucune fonction régulée par QS n'a pu être identifiée mais les gènes impliqués dans le QS sont localisés dans un environnement atypique, constitué de gènes prophagiques. La mise en évidence d'un prophage chez TVV3 a conduit à la caractérisation de phages tempérés chez dix autres souches et au séquençage du premier génome d'un bactériophage isolé d'*Azospirillum*. Ce travail montre que la régulation de type QS est souche spécifique et révèle la prévalence des phages chez *Azospirillum*.

Role of quorum-sensing and bacteriophage prevalence in the phyto-stimulatory bacterium *Azospirillum*

ABSTRACT:

The aim of this work was to identify quorum-sensing (QS) regulated functions in the phyto-beneficial bacterium *Azospirillum*. Inactivation of signal molecules involved in QS has no deleterious effect on the *in vitro* phyto-stimulatory properties of strains B518 and TVV3 (isolated from rice). By combining a targeted approach and a global proteomic approach, QS was shown to regulate functions linked to adaptation to the plant, notably to root colonization, in strain B518. In strain TVV3, no QS-regulated function was identified but QS genes were localized in an atypical environment containing genes of prophage origin. The isolation of phage particles in strain TVV3 led to the characterization of temperate phages in ten other strains and to the sequencing of the first bacteriophage genome isolated from an *Azospirillum* strain. This work indicates that QS regulation is strain-specific and reveals bacteriophage prevalence in *Azospirillum*.

DISCIPLINE : Ecologie Microbienne

MOTS-CLES : *Azospirillum*, lactonase, *N*-acyl-homosérine lactone, pectinase, prophage, quorum-sensing, sidérophore

KEY-WORDS: *Azospirillum*, lactonase, *N*-acyl-homoserine lactone, pectinase, prophage, quorum-sensing, siderophore

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

