



**HAL**  
open science

# Interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère par la dégradation enzymatique des signaux quorum sensing

Mélanie Tannières

► **To cite this version:**

Mélanie Tannières. Interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère par la dégradation enzymatique des signaux quorum sensing. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112050 . tel-00803936

**HAL Id: tel-00803936**

**<https://theses.hal.science/tel-00803936>**

Submitted on 24 Mar 2013

**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.



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences  
DISCIPLINE : BIOLOGIE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL

## Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

**Mélanie TANNIERES**

# Interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère par la dégradation enzymatique des signaux *quorum sensing*

Soutenue le **23 mars 2012**, devant le jury d'examen :

Denis FAURE	Directeur de Recherche, CNRS Gif sur Yvette – Directeur de thèse
Jan MICHIELS	Professeur, Université de Louvain – Rapporteur
Xavier NESME	Ingénieur de Recherche, INRA Lyon – Examinateur
Cornelia REIMMANN	Maître d'enseignement et de recherche, Université de Lausanne – Examinateur
Jacqui SHYKOFF	Directrice de Recherche CNRS, Université Paris Sud – Examinateur
Pascal SIMONET	Directeur de Recherche CNRS, Institution et lieu d'exercice – Rapporteur



## Remerciements

Tout d'abord, je remercie Jan Michiels et Pascal Simonet pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également les autres membres du jury, Jacqui Shykoff, Cornelia Reimann, et Xavier Nesme. Par ailleurs, je remercie les différents membres de mes comités de pilotage pour les discussions et les conseils donnés.

Je tiens à remercier tout particulièrement Denis Faure pour m'avoir encadrée durant mon doctorat, pour son enthousiasme et sa disponibilité. Je n'oublierai pas toutes ces heures de discussion et de réflexion. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de présenter mes travaux à de nombreux colloques ou congrès. Merci également pour ta compréhension concernant mon investissement associatif.

Je remercie la région Ile de France qui m'a financée pendant mon doctorat *via* le réseau de recherche sur le développement soutenable R2DS.

Je remercie Yves Dessaux qui m'a accueillie dans son équipe. Merci de ta bonne humeur, et de ta curiosité sans fin. Je remercie aussi toute l'équipe 313 pour avoir fait de ces années passées au labo un moment agréable et notamment merci à Aurélie et Amélie pour toute l'aide apportée et plus encore. Merci aux autres collègues Yannick, Julien et ex collègues Elise, Emilie... Merci Sam pour toutes les analyses réalisées mais aussi pour le temps consacré à discuter entre deux portes. Merci à mes colocs de bureau, Nico et particulièrement Catherine pour ton sourire, ta générosité, et ton amour des plantes, ce qui a permis d'envahir le bureau d'orchidées. Sara, un petit clin d'œil pour les pauses terrasse et tous ces moments partagés, seules, au labo, le soir ou les week end.

Merci aussi à nos visiteurs Kok Gan et Matt avec qui j'ai beaucoup appris.

Je remercie toutes les personnes du groupement thématique plantes-microbes pour les suggestions pertinentes. Les interactions entre équipes sont aussi importantes que les interactions plantes-microbes.

Au sein de l'ISV, je remercie toutes les personnes du service administratif, Arthur, Christine, Karine, François et Jocelyne, qui font un travail formidable ce qui nous facilite bien les choses. Merci aux serristes, Amandine, Véronique pour les soins donnés à mes plantes. Merci également au service technique, Jean-Paul, Jean-Marc et Patrick. Un énorme merci au service laverie, Zaza, Cindy, Lamia et aussi Patricia, toujours là quand on a besoin de quelque chose à la dernière minute. Les labos ne tourneraient pas si bien si l'on n'avait pas un tel soutien.

Merci aux membres du comité nord de m'avoir invitée aux différents conseils scientifiques mais aussi de m'avoir accueillie de façon chaleureuse au sein de leur station de recherche où j'y ai découvert la production et la sélection des pommes de terre.





Je remercie l'école doctorale ED145. L'ancienne direction : Maryelle et Michel mais aussi la nouvelle équipe, Jacqui, Marianne et Hoang. J'ai passé de très bons moments au sein du bureau des doctorants puis Doc'en herbe. Merci de nous avoir soutenus dans nos projets. Merci à tous les membres de doc' en herbe. Je me rappellerai des réunions-bar pour organiser les PhD days...

Merci Michel de m'avoir poussée à rejoindre ADDOC (Association des doctorants et jeunes docteurs de l'université Paris Sud). S'investir dans cette asso m'a permis de sortir un peu la tête du labo mais j'ai surtout appris énormément et j'ai rencontré d'autres doctorants de disciplines diverses. Blaise, Marie, Julien, avec qui on a remonté l'asso puis la nouvelle équipe, Elsa, JT, Raphaël... avec qui on a réalisé de nombreux projets. Merci à tous.

Enfin, je remercie mon frère Axel, Pierrot et Yas, mes coloc qui m'ont nourrie et supportée pendant plus de deux ans. Je vais enlever mon installation spéciale rédaction de la table basse du salon d'ici peu. Merci pour votre compréhension et tous les bons moments que l'on a vécu ensemble.

Merci à ma mère qui a toujours cru en moi et qui m'a encouragée tout au long de mes études.

Merci à tous mes amis, je n'oublierai pas les sciences apéro et mes histoires de politique communautaire bactérienne. Merci les copains pour le coup de main lors de l'assemblage de ma thèse. Cela a permis de rendre agréable un moment pas si facile...

Merci à tous.



## Liste des abréviations

3OC6HSL : 3-oxo hexanoyl homosérine lactone  
3OC8HSL : 3-oxo octanoyl homosérine lactone  
3OC12HSL : 3 oxododécanoyl homosérine lactone  
3-OH PAME : acide 3-hydroxy palmitique  
ABm : milieu *Agrobacterium* Broth minimal  
ADN-T : ADN-transféré  
AI-2 : autoinducteur 2  
ACP : *acyl carrier protein*  
AIA : acide indol acétique  
AS : amidase signature  
BAC : *bacterial artificial chromosome*  
C4HSL : butyryl homosérine lactone  
C6HSL : hexanoyl homosérine lactone  
C8HSL : octanoyl homosérine lactone  
C10HSL : decanoyl homosérine lactone  
Ch1 : *cheater 1* (tricheur 1)  
Ch2 : *cheater 2* (tricheur 2)  
DGGE : *denaturing gradient gel electrophoresis*  
DPD : 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione  
DSF : *diffusible signal factor*  
GABA : acide gamma-amino butyrique  
GBL : gamma-butyrolactone  
GCL : gamma-caprolactone  
GHB : gamma-hydroxy butyrique  
HPLC : chromatographie liquide à haute performance  
HSL : homosérine lactone  
LBm : Luria Bertani modifié



MS : spectrométrie de masse

MS/2 : milieu Murashige et Skoog

NAHL : N-acyl homosérine lactone

Ntn hydrolase : *hydrolase N-terminal nucléophile*

ORF : *open reading frame*

pAt : plasmide *Agrobacterium tumefaciens*

Pca : *Pectobacterium carotovorum atroseptica*

Pcc : *Pectobacterium carotovorum carotovorum*

PLL : phosphotriestérase like lactonase

PON : paraoxonase

PQS : *Pseudomonas quinolone signal*

pRi : plasmide “*Root inducing*”

pTi : plasmide “*Tumour inducing*”

PTE : phosphotriestérase

QS : *quorum sensing*

QSI : *quorum sensing inhibitor*

QQ : *quorum quenching*

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAM : S-adénosyl méthionine

SSA : acide semi aldéhyde succinique

TLC : *thin layer chromatography*

TSA : *tryptic soy agar*



# Sommaire

Sommaire .....	1
Liste des figures et des tableaux .....	1
Avant-propos.....	4
Chapitre I - Introduction bibliographique .....	6
1    Communication bactérienne : le <i>quorum sensing</i> .....	6
1.1    Le <i>quorum sensing</i> (QS).....	6
1.2    Les autoinducteurs .....	8
1.3    QS chez <i>Pectobacterium</i> .....	12
1.4    QS chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	14
1.5    QS chez <i>Pseudomonas</i> .....	22
1.6    Communication inter-espèces et perturbation de la régulation QS dans la rhizosphère. 26	
2    Dégradation enzymatique des signaux QS.....	30
2.1    Principe du <i>quorum quenching</i> .....	30
2.2    Les activités enzymatiques de dégradation des signaux QS .....	30
2.3    Les enzymes connues .....	34
2.4 <i>Quorum quenching</i> dans les interactions procaryotes/eucaryotes .....	39
2.5 <i>Quorum quenching</i> et métagénomique .....	43
2.6    Conclusions générales .....	47
Objectifs du travail expérimental .....	48
Chapitre II - Evaluation d'une stratégie de quorum quenching par des approches de métagénomique .....	49
1    Summary.....	51
2    Introduction.....	52
3    Results .....	53
3.1    GCL-mediated biostimulation of NAHL-degrading bacteria.....	53
3.2    The <i>rrs</i> -analyses revealed a drastic reshaping of bacterial diversity .....	54





3.3	Identification of a metagenomic fosmid expressing QQ-activity.....	55
3.4	<i>qsdB</i> encodes NAHLase activity.....	55
3.5	<i>qsdB</i> -mediated quorum-quenching in the plant pathogen <i>Pectobacterium</i> .....	56
3.6	QsdB belongs to the amidase signature (AS) family .....	56
3.7	Relative abundance of <i>qsdB</i> in bacterial community.....	57
4	Discussion.....	58
5	Experimental procedures .....	60
5.1	Plant culture .....	60
5.2	Identification of bacterial isolates for NAHL-production and NAHL-degradation .....	60
5.3	DNA extraction from bacterial community .....	60
5.4	<i>rrs</i> -DGGE.....	61
5.5	<i>rrs</i> -pyrosequencing.....	61
5.6	PCR of <i>qsdA</i> , <i>qsdB</i> and <i>attM</i> genes .....	62
5.7	Construction and screening of the metagenomic library.....	62
5.8	Sequencing and phylogenetical analyses of the identified fosmid p90H6.....	62
5.9	NAHL-degradation assays.....	63
5.10	Quantification of NAHL and GCL .....	64
5.11	Soft rot tuber assays.....	64
6	Acknowledgments .....	64
	References.....	65
Chapitre III - Etude de la dégradation des signaux QS pour limiter le transfert de plasmide Ti d'un		
tricheur.....		
1	Introduction.....	71
2	Matériel et Méthodes .....	72
2.1	Conditions de culture .....	72
2.2	Souches bactériennes et plasmides .....	72
2.3	Obtention des opines et des extraits de tumeur .....	73



2.4	Transfert conjugatif du plasmide Ti.....	73
2.5	Mesure des niveaux de NAHL.....	74
2.6	Conditions de culture des plantes.....	75
3	Résultats.....	76
3.1	Sensibilité et efficacité de conjugaison des tricheurs bactériens Ch1 et Ch2.....	76
3.2	Effet de la dégradation des signaux QS sur la conjugaison des tricheurs.....	78
3.3	Association des fonctions de production et de dégradation des signaux QS dans une même bactérie : impact sur le niveau de NAHL exogènes et sur la réponse des tricheurs.....	80
3.4	Rôle de la fonction de dégradation des NAHL associée aux bactéries réceptrices sur le transfert conjugatif des tricheurs.....	82
3.5	Dissociation des fonctions de dégradation et de production.....	83
3.6	Dégradation des signaux QS par des plantes.....	84
3.7	Evaluation du rôle des plantes dégradant les signaux QS sur la conjugaison des tricheurs dans les tumeurs.....	86
4	Discussion.....	87
Chapitre IV – Discussion générale et perspectives.....		90
1	<i>Quorum quenching</i> et métagénomique.....	90
2	<i>Quorum quenching</i> dans les interactions bactéries/eucaryotes.....	96
Perspectives.....		103
Bibliographie.....		105
Annexes.....		127



## Liste des figures et des tableaux

### Chapitre I :

**Figure 1 :** *Euprymna scolopes*

**Figure 2 :** Représentation de la régulation *Quorum Sensing* chez *Vibrio fischeri*

**Figure 3 :** Diversité des NAHL

**Figure 4 :** Diversité des molécules signal chez les bactéries

**Figure 5 :** Diversité des opines chez les agrobactéries

**Figure 6 :** Galle du collet sur Rosier

**Figure 7 :** Régulation *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

**Figure 8 :** Dégradation des signaux *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

**Figure 9 :** Formation de biofilm chez les bactéries

**Figure 10 :** Caractéristiques structurales et fonctionnelles des récepteurs LuxR-solos chez des protéobactéries

**Figure 11 :** Types d'activité enzymatique de dégradation des NAHL

**Figure 12 :** Analyse métagénomique de communautés microbiennes environnementales

**Tableau 1 :** Enzymes de dégradation des NAHL

### Chapitre II :

**Figure 1 :** Characteristics of cultured populations in GCL-treated plant cultures and untreated plant control.

**Figure 2 :** *rrs*-DGGE of the GCL-treated and untreated plant cultures

**Figure 3 :** *rrs*-pyrosequenced diversity of bacteria in GCL-treated and untreated plant cultures



**Figure 4** : Simplified map the fosmid p90H6 and sub-cloning of *qsdB*

**Figure 5** : Evidence of NAHL-degradation activity of QsdB by HPLC/MS analysis

**Figure 6** : QsdB-mediated quorum-quenching in *P. carotovorum*

**Figure 7** : Phylogeny of QsdB and its closely relatives

**Figure 8** : Phylogeny of the AS family

**Figure 9** : Relative abundance of NAHL-degradation genes in GCL-treated and untreated batches

**Tableau 1**: ORFs of the p90H6 DNA-insert

### Chapitre III :

**Figure 1** : OC8HSL-dependent transfer of the plasmid Ti from the cheater-1 and -2 to the recipient strain C58.00

**Figure 2** : Cheaters may use the OC8HSL produced by *A. tumefaciens* C58 derivatives to promote transfer of their own plasmid Ti into the recipient strain C58.00

**Figure 3** : Cheaters may use the NAHL produced by *Agrobacterium* and *Pectobacterium* isolates to promote transfer of their own plasmid Ti into the recipient strain C58.00

**Figure 4** : Lactonase AiiB-mediated degradation of OC8HSL in culture medium

**Figure 5** : Lactonase AiiB-mediated degradation of OC8HSL affected transfer of plasmid Ti from cheater to recipient bacteria

**Figure 6** : Bacterial populations, in which production and degradation of OC8HSL were associated, were able to limit sexual cheating

**Figure 7** : Limitation of sexual cheating under natural induction of lactonase AiiB and synthesis of OC8HSL in the presence of agrocinopine

**Figure 8** : lactonase expressing recipient strain may affect sexual cheating

**Figure 9** : Impact of a degrader on cheating





**Figure 10** : Degradation of OC8HSL by transgenic tobacco plants expressing a bacterial lactonase

**Figure 11** : Plant can disturb plasmid conjugation by modulating NAHL levels

**Figure 12** : Conjugation assays in NAHL-degrading plant rhizosphere

**Figure 13** : Conjugation assays in NAHL-degrading plant rhizosphere in presence of OC8HSL-producers

**Figure 14** : Conjugation assays in tobacco plant expressing the lactonase

**Tableau 1** : Bacterial strains and plasmids



## Avant-propos

Les bactéries sont des organismes de la taille du micromètre qui définissent un des trois domaines du vivant aux côtés des Archées et Eucaryotes. Elles constitueraient la biomasse la plus importante sur Terre ; par exemple leur abondance est estimée à plusieurs dizaines de millions d'individus par gramme de sol. Les bactéries sont retrouvées dans des milieux terrestres et aquatiques très divers, mais elles colonisent aussi d'autres organismes vivants comme les eucaryotes. Afin d'assurer leur survie, les bactéries ont évolué de nombreuses fonctions dédiées à la perception des changements environnementaux, et à la mise en place d'une réponse la plus appropriée. Ces fonctions sont régulées à l'échelle de la cellule bactérienne, mais aussi de la population grâce à des systèmes remarquables qui seront étudiés dans ce doctorat. Ces organismes présentent également une importante plasticité génétique, notamment par le transfert horizontal (conjugaison) de gènes codés par des plasmides.

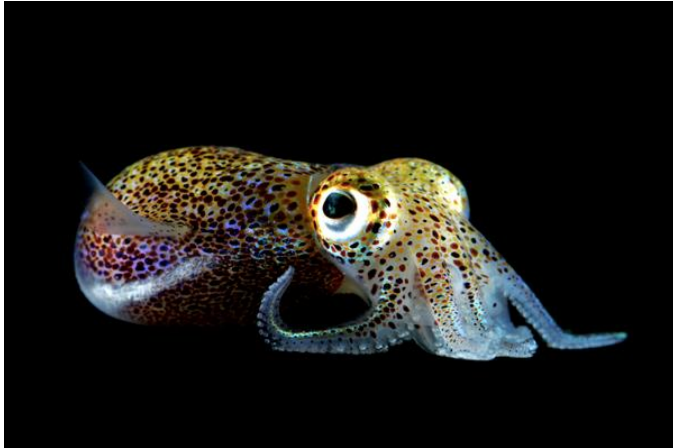
Dans les années 1970, un système de coordination de l'expression de certaines fonctions au niveau d'une population a été découvert chez les bactéries. Cette communication intercellulaire, appelée *quorum sensing* (QS) a été définie comme un mode de régulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 1994). Aujourd'hui, les fonctions connues comme régulées par QS sont très diverses : bioluminescence, production d'antibiotiques, formation de biofilms, nodulation, transfert conjugatif de plasmides, virulence. Chez de nombreuses bactéries pathogènes, la communication QS régule l'expression de fonctions liées à la virulence. C'est notamment le cas de *Pectobacterium carotovorum*, pathogène de la pomme de terre, dont la capacité à produire des enzymes de macération est régulée par QS ; et chez *Agrobacterium tumefaciens*, pathogène à large spectre de plantes hôtes dont la conjugaison du plasmide codant les facteurs de virulence est aussi contrôlée par QS. Parce qu'il met en relation plusieurs individus d'une population (intra-spécifique ou infra-clonale) ou d'une communauté (inter-spécifique), le QS révèle et éclaire des concepts nouveaux chez les bactéries comme la coopération ; certains auteurs allant jusqu'à comparer les populations bactériennes à des organismes multicellulaires (Shapiro, 1998).

Depuis les années 2000, la découverte de bactéries mais aussi d'organismes eucaryotes capables d'interférer avec cette communication QS, notamment via des enzymes capables de dégrader les signaux moléculaires du QS, a ouvert un nouveau champ de recherche pour comprendre les interactions biologiques, et a élargi les stratégies de lutte contre les



pathogènes dont la virulence est régulée par QS. L'apparition au cours de l'évolution de mécanismes de contrôle de la signalisation QS chez les bactéries et les eucaryotes montre qu'elle constitue un véritable enjeu dans l'écologie des bactéries, et plus particulièrement lors de leurs interactions avec les eucaryotes.

Le premier chapitre de ce mémoire présente une synthèse bibliographique sur la communication QS et la dégradation enzymatique des signaux QS. Les chapitres II et III présentent les résultats expérimentaux obtenus au cours de mon doctorat sur l'interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère *via* la dégradation enzymatique des signaux QS. Enfin, la discussion générale et les perspectives de ce travail sont présentées dans le chapitre IV.



**Figure 1** : *Euprymna scolopes*,  
hôte de *Vibrio fischeri*  
<http://www.kahikai.org/>

# Chapitre I - Introduction bibliographique

## 1 Communication bactérienne : le *quorum sensing*

### 1.1 Le *quorum sensing* (QS)

#### 1.1.1 Historique et principe

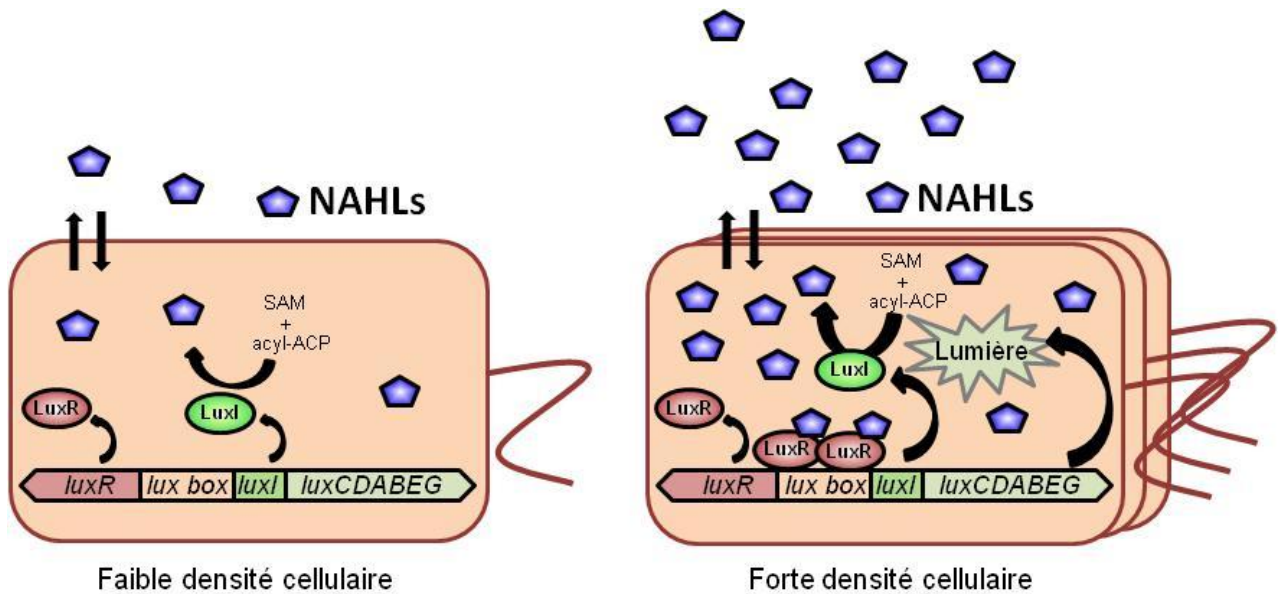
Le premier mécanisme de régulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire a été identifié dans les années 1970 chez *Vibrio fischeri*. Cette  $\gamma$ -protéobactérie marine est connue pour sa capacité à produire de la lumière dans certains organes spécifiques de ses hôtes, comme le calamar *Euprymna scolopes* (Figure 1). Ce phénomène de bioluminescence est lié à l'oxydation de la luciférine par l'enzyme luciférase aboutissant à l'émission d'un photon. *In vitro*, cette activité n'est pas observée dans une culture à faible densité cellulaire de *Vibrio fischeri*. Cependant, la production de lumière est induite lorsque la croissance atteint la phase exponentielle. L'addition de surnageants de culture de *Vibrio fischeri* à forte densité cellulaire à une autre culture à faible densité permet aussi l'induction de la bioluminescence (Kempner et Hanson, 1968). La bioluminescence est donc une fonction activée à forte densité cellulaire. *Vibrio fischeri* vit sous forme libre dans les eaux marines dans lesquelles sa densité cellulaire est inférieure à  $10^2$  bactéries/ml mais leur densité peut atteindre  $10^{10}$  bactéries dans les organes de ses hôtes (Hastings et Mitchell, 1971). L'émission de bioluminescence permettrait aux hôtes l'attraction des proies ou des partenaires sexuels mais aussi une protection contre les prédateurs (Widder, 2010). La symbiose conférerait également un avantage nutritif et une protection aux bactéries.

Ce système de régulation de l'expression de gènes en fonction de la densité cellulaire fait intervenir un signal qui doit être produit, diffusé et perçu par les bactéries. Le terme d'autoinducteurs a été utilisé pour définir ces molécules signal dont la concentration est directement corrélée à la densité bactérienne (Nealson *et al.*, 1970).

#### 1.1.2 Le système LuxI/LuxR

Chez *Vibrio fischeri*, le gène *luxI* a été identifié comme codant la synthèse de l'autoinducteur N-3-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone ou 3OC6HSL de la famille des N-acyl homoserine lactones ou NAHL (Eberhard *et al.*, 1981). Ce gène code une protéine cytoplasmique de 193 acides aminés et appartient à l'opéron *luxICDABEG* dont les autres





**Figure 2 :** Représentation de la régulation *Quorum Sensing* chez *Vibrio fischeri*

Le SAM (*S-Adenosyl-Methionine*) et l'acyl-ACP (*Acyl Carrier Protein*) sont les précurseurs des NAHL. A faible densité cellulaire, la synthèse de NAHL via LuxI est faible. Le récepteur LuxR ne perçoit pas les NAHL. Il n'y a pas d'induction de la transcription de l'opéron *luxICDABEG*. A forte densité cellulaire, les NAHL en plus forte concentration sont perçues par le récepteur LuxR. Le complexe constitué de deux molécules LuxR et de deux molécules de NAHL se fixe à la boîte *lux* et active la transcription de l'opéron *luxICDABEG*. Il y a une augmentation de la production de NAHL et émission de lumière.

gènes sont impliqués dans la production de bioluminescence (Figure 2). Le gène *luxR* situé environ 200 pb en amont de l'opéron *lux* code une protéine de 250 acides aminés. La protéine LuxR est le récepteur de la 3OC6HSL. La région séparant *luxI* et *luxR* contient leurs promoteurs respectifs ainsi qu'une séquence palindromique de 20 pb nommée boîte *lux*. Ce motif est indispensable à l'activation de la transcription de l'opéron *lux* (Steeven et Greenberg, 1997). A faible densité cellulaire, *luxI* est transcrit à un niveau basal. La faible concentration des molécules signal produit ne permet pas leur perception par le récepteur LuxR. Quand la densité cellulaire augmente, les signaux QS vont s'accumuler dans le milieu extra et intracellulaire jusqu'à une concentration seuil au-delà de laquelle le récepteur LuxR perçoit la 3OC6HSL. LuxR est également un régulateur transcriptionnel. Le complexe LuxR-3OC6HSL se fixe sur la boîte *lux* ce qui induit la transcription de l'opéron *luxICDABEG*. L'expression de LuxI entraîne une augmentation de la production de 3OC6HSL (voir plus bas) tandis que celle de LuxCDABEG permet la production de bioluminescence. Une boucle de rétroaction positive est alors enclenchée (Figure 2).

### 1.1.3 Un système répandu

La plupart des types de régulation QS décrits à ce jour chez les bactéries à coloration de Gram négative sont des systèmes homologues à celui de *Vibrio fischeri*, et sont souvent impliqués dans des relations bactéries-eucaryotes symbiotiques, pathogènes ou mutualistes. L'analyse de 265 génomes de protéobactéries a révélé la présence de 68 espèces possédant au moins un système homologue à LuxI/LuxR, reposant sur la production et la perception de molécules signal de la famille des NAHL (Case *et al.*, 2008). Ces homologues ont été découverts sur des plasmides ou des chromosomes bactériens (Fuqua et Winans, 1994 ; Whitehead *et al.*, 2001). Ainsi on retrouve le système ExpI/ExpR ou les systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR sur les chromosomes de *Pectobacterium atrosepticum* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement, ou encore TraI/TraR sur le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Plusieurs systèmes QS homologues à LuxI/LuxR peuvent être présents chez le même organisme (Pesci *et al.*, 1997, Zhang et Pierson, 2001). Cependant, les gènes sont peu conservés ; les protéines de type LuxI présentent un pourcentage d'identité de séquence de 28 à 35% et celles de type LuxR de 18 à 25% (Fuqua *et al.*, 1996). De plus, les différences dans la séquence de ces gènes au sein d'une espèce peuvent être plus grandes qu'entre espèces proches (Gray et Garey, 2001). Des analyses phylogénétiques sur les gènes homologues à *luxI*



et *luxR* (fonctionnels ou putatifs) mettent en évidence l'existence de deux familles distinctes pour chaque composant du système QS. On retrouve ainsi une première famille regroupant diverses protéobactéries et une seconde comportant uniquement des  $\gamma$ -proteobacteria (Lerat et Moran, 2004).

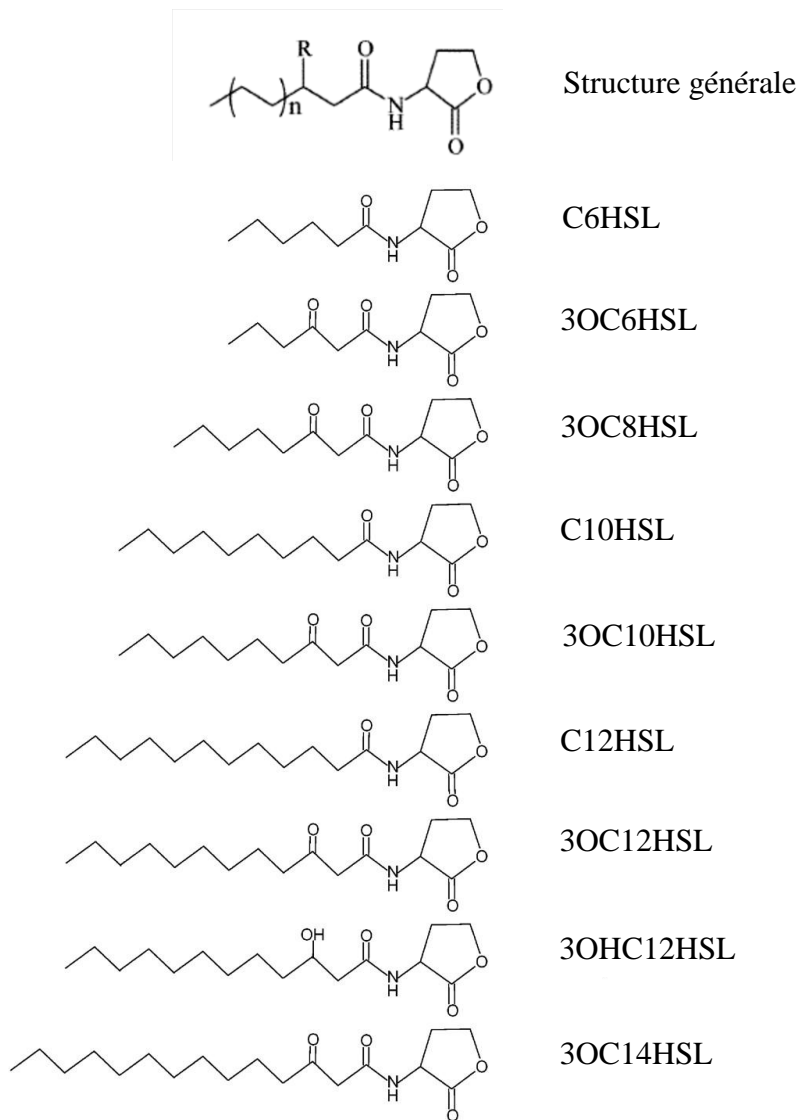
De nombreuses bactéries présentent donc un système de régulation corrélé à la densité cellulaire faisant intervenir une molécule signal de la famille des NAHL. Chaque récepteur reconnaît généralement une structure de NAHL spécifique. Cette spécificité du ligand pour son récepteur, pourrait provenir d'un phénomène de sélection favorisant l'apparition de signaux distincts pour créer des systèmes de communication intra-espèces *via* l'utilisation d'un type de signal spécifique à cette espèce bactérienne. Cependant la présence de plusieurs systèmes LuxR/LuxI au sein d'une même espèce ainsi que la spécificité plus ou moins large des récepteurs des signaux QS pourrait permettre une communication inter-espèces. D'autres signaux de communication ont également été décrits, élargissant les possibilités de communication bactérienne et diminuant la probabilité d'interférences par l'utilisation de signaux différents selon les espèces.

## 1.2 Les autoinducteurs

Les autoinducteurs ou molécules signal sont des molécules secrétées par les bactéries et « utilisées » pour mesurer la densité cellulaire. Plus récemment, quatre critères ont été proposés pour définir une molécule d'autoinducteur (Winzer *et al.*, 2002) : i) la molécule est produite dans certaines conditions, en réponse à un stimulus environnemental ou à un moment particulier de la croissance ; ii) la molécule s'accumule dans le milieu extracellulaire et est reconnue par un récepteur spécifique ; iii) au-delà d'un seuil de concentration, les bactéries entament une réponse collective; iv) cette réponse doit dépasser les mécanismes liés au catabolisme de la molécule. Ces molécules sont perçues par les microorganismes à des concentrations variant du pM au mM.

### 1.2.1 Les N-acyl homosérine lactones

Les NAHL ont été identifiées pour la première fois comme autoinducteur chez *Vibrio fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981) et la production de NAHL est aujourd'hui observée chez plus de 70 espèces bactériennes.



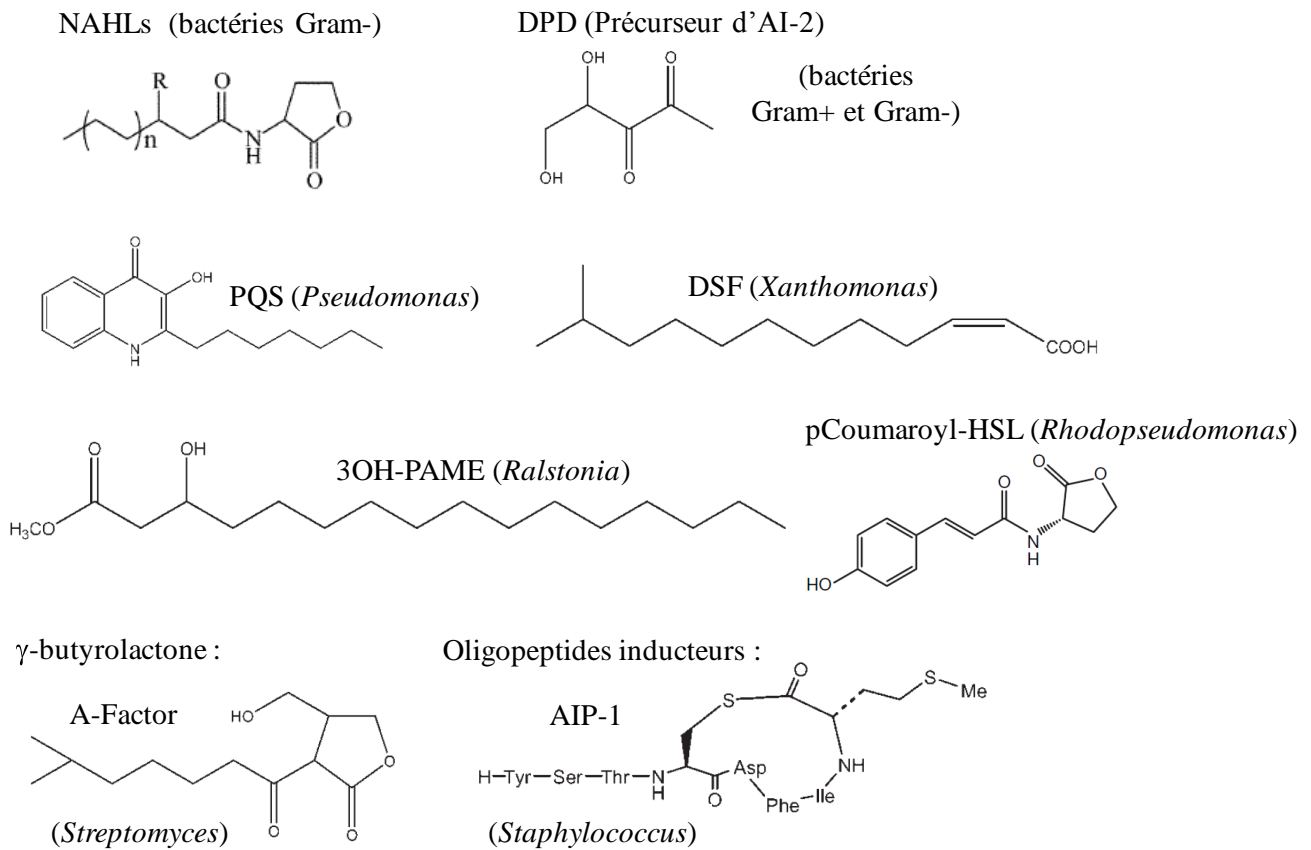
**Figure 3** : Diversité des NAHLs. D'après Uroz *et al*, 2005

#### 1.2.1.1 Synthèse des NAHL

Les NAHL sont synthétisées à partir de molécules issues du métabolisme primaire. Les enzymes responsables de la synthèse des NAHL sont majoritairement des protéines de type LuxI qui catalysent la formation d'une liaison amide entre une chaîne d'acide gras portée par une *acyl carrier protein* (ACP) et la *S-Adenosyl-Methionine* (SAM) (Schaefer *et al.*, 1996). Certains homologues à LuxI permettent la synthèse de plusieurs NAHL avec des chaînes d'acide gras de longueurs différentes. La spécificité de ces NAHL-synthétases est liée à des différences de résidus dans leurs séquences protéiques leur conférant alors une capacité de synthèse d'un ou plusieurs types de NAHL (Brader *et al.*, 2005). Deux autres types de protéines sans similarité avec LuxI ont également la capacité de synthétiser les NAHL. Le premier type regroupe les protéines AinS de *Vibrio fischeri* (Hanzelka *et al.*, 1999), LuxM de *Vibrio harvey* (Bassler *et al.*, 1993) et VanM de *Vibrio anguillarum* (Milton *et al.*, 2001) responsables de la synthèse de différentes NAHL. Le deuxième type est représenté par la protéine HdtS identifiée chez *Pseudomonas fluorescens* F113 et définissant une troisième famille capable de synthétiser des NAHL. Ces deux types de protéines synthétisent les NAHL en transférant à la SAM une chaîne d'acide gras provenant de l'acyl-ACP ou l'acyl coenzyme A (Laue *et al.*, 2000).

#### 1.2.1.2 Structures et diversité

Les N-acyl homosérine lactones sont constituées d'un noyau lactone relié à une chaîne d'acide gras plus ou moins longue par une liaison amide. Les NAHL dites à chaînes courtes comportent 4 à 8 carbones alors que les NAHL à chaînes longues peuvent en compter jusqu'à 18. Généralement, les atomes de carbone sur la chaîne d'acide gras sont en nombre pair. La présence d'insaturations à différents endroits de la chaîne, ou d'une substitution oxo- ou hydroxy- sur le carbone C3 permet aussi d'augmenter la diversité des signaux NAHL (Figure 3). Il a été découvert chez *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium sp* et *Silicibacter pomeroyi* que ces bactéries utilisent des nouvelles molécules signal de type homosérine lactones. Ces bactéries possèdent un système RpaI/RpaR basé sur la synthèse de p-coumaroyl-HSL dont un des précurseurs, l'acide p-coumarique provient des plantes (Schaefer *et al.*, 2008). Ces bactéries détournent le métabolisme de la plante afin de synthétiser les signaux de communication bactériens.



**Figure 4** : Diversité des molécules signal chez les bactéries.  
Adapté de Williams, 2007.

Les N-acyl homosérines lactones (NAHL) sont des signaux utilisés par de nombreuses bactéries à coloration de Gram négative. Le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) est le précurseur des signaux de type AI-2 dont la production est observée chez de nombreuses bactéries à coloration de Gram positive et négative. Le signal *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) est utilisé par certaines bactéries du genre *Pseudomonas*. *Xanthomonas* utilise un signal nommé DSF pour *Diffusible Signal Factor*, et *Ralstonia* l'acide hydroxy-palmitique (3-OH-PAME). *Rhodopseudomonas* utilise un composé de plante, l'acide coumarique pour produire son signal QS, le pCoumaroyl-homosérine lactone. Certaines bactéries comme *Streptomyces* produisent des  $\gamma$ -butyrolactones comme molécule signal. Des oligopeptides inducteurs sont utilisés par des bactéries du genre *Staphylococcus* ou *Bacillus*.

### 1.2.1.3 Transport et accumulation dans l'environnement

Les NAHL ont une structure qui leur confère un caractère hydrophile du au noyau homosérine lactone et lipophile du à la chaîne d'acide gras. Ces propriétés leur permettent de diffuser librement dans les membranes en suivant le gradient de NAHL de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule et *vice versa*. Les concentrations intra et extracellulaires sont donc équivalentes (Kaplan et Greenberg, 1985). Des études ont cependant montré que le transport de NAHL à chaînes longues peut impliquer une pompe à efflux comme chez *Pseudomonas aeruginosa* (Evans *et al.*, 1998 ; Pearson *et al.*, 1999).

Le terme de *quorum sensing* désigne la synchronisation de l'expression des gènes en fonction de la densité cellulaire. Cependant, l'accumulation des NAHL dans l'environnement est sensiblement différente si le milieu est ouvert ou fermé. La diffusion des molécules signal est un facteur important dans la régulation QS. Dans un milieu ouvert, le coefficient de diffusion de la molécule doit donc être pris en compte. Le terme de *diffusion sensing* a été proposé dans ce cas (Redfield, 2002). Les structures telles que les biofilms ou les agrégats pourraient permettre dans des milieux ouverts d'atteindre la densité cellulaire nécessaire à l'activation ou la répression de fonctions régulées par QS (McLean *et al.*, 1997). De même, les tumeurs ou nodules induits par les rhizobactéries ou les organes spécifiques d'animaux représentent des espaces restreints dans lesquels la régulation QS peut être favorisée. Il faut cependant noter que certains facteurs supplémentaires comme des inhibiteurs des systèmes QS ou des enzymes de dégradation des signaux QS peuvent perturber la signalisation QS *via* une modulation de la synthèse ou de la stabilité des molécules.

## 1.2.2 Les autres autoinducteurs

Les signaux QS de type NAHL sont très largement répandus mais d'autres types de signaux de communication existent également. Ces signaux ont été identifiés dans des surnageants de culture puis analysés par des techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les principales classes d'autoinducteurs autres que les NAHL sont présentées dans cette partie (Figure 4).

### 1.2.2.1 Le *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS)

Chez certaines bactéries du genre *Pseudomonas*, la présence de dérivés de quinolones dans le milieu de culture a été mise en évidence (Pesci *et al.*, 1999). La molécule identifiée est





la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone appelée également PQS pour *Pseudomonas Quinolone Signal*. Ces molécules sont structurellement proches des antibiotiques de la famille des quinolones mais ne présentent aucune activité antimicrobienne. Ces molécules peuvent être exportées par le même système de pompes à efflux qu'utilisent les antibiotiques de la famille des quinolones et aussi les NAHL (Lamarche *et al.*, 2011). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, cette molécule s'accumule en fin de phase stationnaire et contrôle l'expression de *lasB* impliqué dans la synthèse d'élastase, un des facteurs de virulence majoritaire (Mc Knight *et al.*, 2000).

#### 1.2.2.2 Les autres molécules signal

Le pathogène de la pomme de terre *Ralstonia solanacearum* utilise l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxy-palmitique ou 3-OH PAME pour réguler sa virulence (Clough, 1994 ; Flavier *et al.*, 1997), tout comme *Xanthomonas* utilise un signal appelé DSF (pour *Diffusible Signal Factor*) qui correspond à l'acide cis-11-méthyl-2-dodécanoïque (Wang *et al.*, 2004).

Chez les bactéries à coloration de Gram positif, différentes molécules signal impliquées dans la communication QS ont également été identifiées telles que les  $\gamma$ -butyrolactones découvertes chez des bactéries de type *Streptomyces* et certaines souches d'*Actinoplanes* et *Amycolatopsis* (Choi *et al.*, 2003). De même, des bactéries du genre *Staphylococcus* ou *Bacillus* produisent des oligopeptides autoinducteurs. Dans ce cas, le mécanisme de régulation diffère du système LuxI/LuxR et consiste en un système à deux composantes faisant intervenir une protéine membranaire. Après avoir perçu la molécule signal, le senseur transmet l'information au régulateur transcriptionnel *via* une cascade de signalisation faisant intervenir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. Ces mécanismes impliquent souvent un transport actif de l'autoinducteur vers l'extérieur de la cellule bactérienne (Sturme *et al.*, 2002).

La production de dérivés du 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) a été observée chez plus de 70 espèces bactériennes (Lowery *et al.*, 2008). Initialement découverte chez des mutants de *Vibrio harveyi* déficients pour la synthèse de NAHL mais produisant de la lumière, la molécule responsable de l'induction du système de bioluminescence avait alors été définie comme l'autoinducteur-2 (AI-2). Le précurseur d'AI-2 a été identifié postérieurement comme étant le DPD codé par une synthase nommée LuxS et ses homologues (Ryan et Dow, 2008). La grande répartition des bactéries utilisant AI-2 comme molécule signal suggère qu'il pourrait constituer un langage universel entre ces organismes (Miller et Bassler, 2001).



La mise en évidence de l'existence de différents réseaux de communication bactériens *via* la production et la perception de molécules signal diverses montre l'importance pour les bactéries, organismes procaryotes et supposés individualistes, de la communication intercellulaire afin d'optimiser certaines fonctions à l'échelle d'une population. Dans la suite de cette partie, différents modèles de régulation QS faisant intervenir les NAHL comme molécule signal sont présentés.

### 1.3 QS chez *Pectobacterium*

#### 1.3.1 *Pectobacterium* et son pouvoir pathogène

Le genre bactérien *Pectobacterium* regroupe les *Pectobacterium carotovorum atrosepticum* (Pca) anciennement *Erwinia carotovora sp atroseptica*, et les *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (Pcc) ex *Erwinia carotovora*. Ce sont des bactéries phytopathogènes pouvant infecter un large spectre d'hôtes comme la pomme de terre, les carottes, et le melon. Les symptômes spécifiques sont la pourriture molle sur tubercule de pomme de terre et la jambe noire sur tige. Les agents pathogènes qui vivent dans la rhizosphère, rentrent dans la plante par les ouvertures naturelles telles que les lenticelles ou par les blessures. Dans un premier temps, les bactéries s'engagent dans une phase de multiplication intense. Dans un second temps, quand la densité cellulaire atteint un certain seuil, débute la sécrétion d'enzymes de macération telles que des cellulases, des protéases et des pectinases permettant la dégradation des parois végétales (Smadja *et al.*, 2004). Certaines souches produisent également du carbapénème, un antibiotique qui permettrait de favoriser la colonisation du milieu par les *Pectobacterium* en contrôlant la croissance des autres espèces bactériennes présentes (Axelrod *et al.*, 1988 ; Bainton *et al.*, 1992). Chez *Pectobacterium*, la production d'enzymes de macération, d'antibiotiques mais aussi de sidérophores est régulée par QS (Barnard et Salmond, 2007).

#### 1.3.2 Signalisation QS

##### 1.3.2.1 Présentation du Système QS

Le système QS de *Pectobacterium* est homologue à LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri*. La plupart des souches de *Pectobacterium atrosepticum* produisent majoritairement de la 3-oxo-C8HSL mais elles peuvent aussi produire d'autres NAHL comme la 3-oxo-C6HSL (Chatterjee *et al.*, 2005). Dans plusieurs souches, un seul gène homologue à *luxI* a été décrit ce qui sous-entend que certains homologues ont la capacité de synthétiser différentes NAHL.



Selon les souches, la protéine homologue à LuxI est nommée CarI (Jones *et al.*, 1993), ExpI, (Pirhonen *et al.*, 1993) ou encore HsII (Swift *et al.*, 1993). Ces bactéries possèdent également le récepteur et régulateur transcriptionnel homologue à LuxR qui permet de percevoir le signal QS et d'induire une réponse concertée au niveau de la population bactérienne. Il est appelé ExpR (ou ExpR1) chez *Pectobacterium atrosepticum* et EccR chez *Pectobacterium carotovorum*. Un deuxième homologue à LuxR a également été identifié chez plusieurs souches. Dans le cas des deux souches citées précédemment, ils ont été nommés respectivement ExpR2 et VirR. Chez *Pectobacterium carotovorum*, un troisième homologue nommé CarR est impliqué dans la régulation de la production de carbapénème.

#### 1.3.2.2 Régulation QS

A faible densité cellulaire, la production de signaux QS *via* les homologues à LuxI se situe à un niveau basal. Dans ces conditions, les protéines ExpR1 et ExpR2 agiraient comme répresseurs de la production d'enzymes de dégradation de la paroi végétale. Il a été montré que ces deux protéines interagissent avec la région promotrice du régulateur *rsmA* et activent sa transcription (Cui *et al.*, 2005). La protéine RsmA peut se fixer à des ARNm spécifiques et les adresser à la machinerie de dégradation des ARNs. Ainsi, un mutant *rsmA* chez *Pectobacterium carotovorum* surexprime les enzymes de dégradation des parois végétales et une plus grande agressivité sur l'hôte est observée (Cui *et al.*, 1995). RsmA est décrit comme un répresseur post-transcriptionnel, empêchant la traduction des facteurs de virulence d'opérer. Le second composant, *rsmB*, est un petit ARN non traduit qui se lie à RsmA, l'empêchant ainsi d'agir sur les transcrits cibles (Liu *et al.*, 1998). A forte densité cellulaire, la formation du complexe ExpR / NAHL empêche ExpR d'activer la transcription de *rsmA*. La répression de l'expression des facteurs de virulence est levée et la production d'exoenzymes augmente considérablement. Le système *rsm* est donc directement en lien avec le système QS de *Pectobacterium*. Le couple RsmA-*rsmB* pour « *regulator of secondary metabolites* » est un système de régulation post-transcriptionnelle retrouvé chez de nombreux procaryotes et notamment des pathogènes pour réguler l'expression de facteurs de virulence, la formation de biofilm, ou encore la production d'antibiotiques.

Le gène *carR*, homologue à *luxR* est situé en amont de l'opéron *carABCDEFGH* qui code les protéines requises pour la synthèse de carbapénème. A forte densité cellulaire, le complexe CarR/3OC6HSL active la transcription de l'opéron *car* (McGowan *et al.*, 1995) et la production d'antibiotique. La régulation par QS de la production d'antibiotique permet



d'éviter une production faible et inefficace par des bactéries isolées et de produire une quantité d'antibiotique suffisante pour neutraliser, à forte densité cellulaire, des bactéries en compétition pour le milieu et les ressources.

La signalisation QS chez *Pectobacterium* régule donc la production des facteurs de virulence nécessaire au pouvoir pathogène de la bactérie, mais aussi la production d'antibiotiques. Cette signalisation nécessite un système de régulation complexe faisant intervenir de nombreux régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels.

#### 1.4 QS chez *Agrobacterium tumefaciens*

##### 1.4.1 *Agrobacterium*

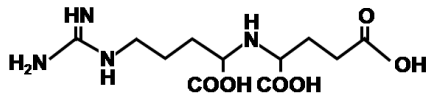
###### 1.4.1.1 Ecologie /classification

Les Rhizobiacées sont des  $\alpha$ -protéobactéries présentes dans le sol ou au voisinage du système racinaire des plantes. On distingue plusieurs genres bactériens dans cette famille. Le premier est représenté par le groupe des *Agrobacterium* et le second par *Rhizobium* qui interagissent de manière symbiotique avec des plantes de la famille des légumineuses et qui ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec leur hôte.

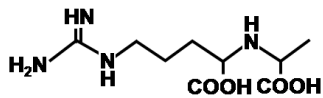
###### 1.4.1.2 Diversité des plasmides

Les souches pathogènes d'*Agrobacterium* possèdent un plasmide Ri (*A. rhizogenes*) ou Ti (*A. tumefaciens*). Une grande diversité au sein de ces plasmides existe selon les souches. Le plasmide Ti, pour « Tumor inducing » porte l'ADN-T, pour « ADN-transféré », qui s'intègre dans le génome de la plante. Certains des gènes situés sur l'ADN-T sont responsables de la synthèse d'hormones végétales à l'origine de la formation de la tumeur. D'autres gènes sont responsables de la synthèse de petites molécules dérivant de sucres simples, d'acides organiques et d'acides aminés, appelées opines (Tempé *et al.*, 1983). D'une façon générale, les bactéries portent également sur le plasmide Ti ou Ri les gènes nécessaires au catabolisme de ces opines (Petit *et al.*, 1983). La diversité de ces molécules est grande et permet ainsi une classification des bactéries selon le type d'opine utilisée comme la nopaline, l'octopine, ou la mannopine (Figure 5). Une même bactérie peut utiliser généralement au moins deux types d'opines. Ainsi, *A. tumefaciens* C58 possède les gènes *noc* et *acc* pour le catabolisme de la nopaline et des agrocinopines A et B respectivement (Hayman et Farrand, 1988). Les *Agrobacterium* sont donc des utilisateurs d'opines, avec des caractéristiques

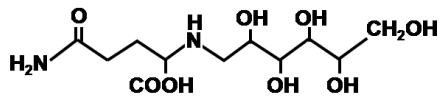




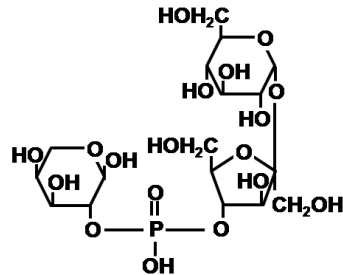
Nopaline = Arginine +  $\alpha$ -Kétoglutarate



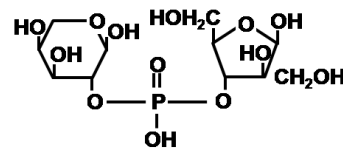
Octopine = Arginine + pyruvate



Mannopine = Glutamine + mannose



Agrocinnopine A = Sucrose + L-arabinose  
liés par un pont phosphodiester



Agrocinnopine B = D-fructose + L-arabinose  
liés par un pont phosphodiester

**Figure 5** : Diversité des opines chez les agrobactéries  
(Thèse Sara planamente)

Selon le type d'opine, les précurseurs impliqués sont différents.

différentes et chaque type d'opine est perçu par des protéines régulatrices spécifiques qui induisent des gènes requis pour le transport et le catabolisme de ces opines (Zanker *et al.*, 1992).

L'acquisition par une bactérie du plasmide Ti (pTi) peut lui permettre d'accéder à des ressources qu'elle ne pouvait assimiler auparavant. Il a été montré que d'autres espèces bactériennes rhizosphériques peuvent assimiler les opines comme source de carbone, telles des bactéries du genre *Pseudomonas* ou *Arthrobacter*. La tumeur serait un environnement particulièrement favorable à la croissance des *Agrobacterium* de part leur capacité à utiliser les opines produites par la plante et cette structure permettrait d'éviter que des utilisateurs de la rhizosphère consomment ces nutriments. Des bactéries du genre *Pseudomonas* peuvent néanmoins être retrouvées au sein de la niche écologique que représente la tumeur. Il y a alors compétition entre *Agrobacterium* et *Pseudomonas* pour les ressources opines (Moore *et al.*, 1997). Les opines servent ainsi de nutriments aux bactéries mais certaines sont aussi impliquées dans le mécanisme de conjugaison du pTi, comme les agrocinopines chez *A. tumefaciens* C58 (White et Winans, 2007). Elles sont appelées dans ce cas opines conjugatives. Les opines jouent donc un rôle dans l'écologie des agrobactéries et elles constituent également une molécule signal importante dans la régulation QS.

#### 1.4.1.3 Le cas d'*Agrobacterium tumefaciens* C58

*Agrobacterium tumefaciens* est présente dans le sol et la rhizosphère des plantes hôtes (ex : la tomate) et non-hôtes (ex : le maïs). Elle est responsable de la galle du collet, une maladie caractérisée par le développement d'une excroissance tissulaire, appelée communément tumeur (Figure 6). *A. tumefaciens* montre un large spectre d'hôtes parmi plus de 90 familles dont la plupart des dicotylédones. D'importantes pertes lors de cultures potagères (ex : tomate), fruitières (ex : pommier), ornementales (ex : rosier), et forestières (ex : peuplier) sont associées à ce pathogène (Escobar *et al.*, 2003). *A. tumefaciens* n'est pas une espèce bactérienne à proprement parler mais un complexe d'une dizaine d'espèces très apparentées appelées génomovars ou groupes génomiques (Costechareyre *et al.*, 2009 et 2010). La souche *A. tumefaciens* C58, isolée de tumeurs de *Prunus*, dont la séquence du génome a été entièrement déterminée, est représentative du groupe génomique 8. Elle héberge un chromosome linéaire (2,07 Mb), un chromosome circulaire (2,84 Mb) et deux plasmides, le plasmide At pour « *Agrobacterium tumefaciens* » de 543 kb, et le pTi de 214 kb.



**Figure 6 :** Galle du collet sur Rosier

## 1.4.2 – QS chez *A. tumefaciens* C58

### 1.4.2.1 Etapes précoces du cycle infectieux d'*A. tumefaciens* C58

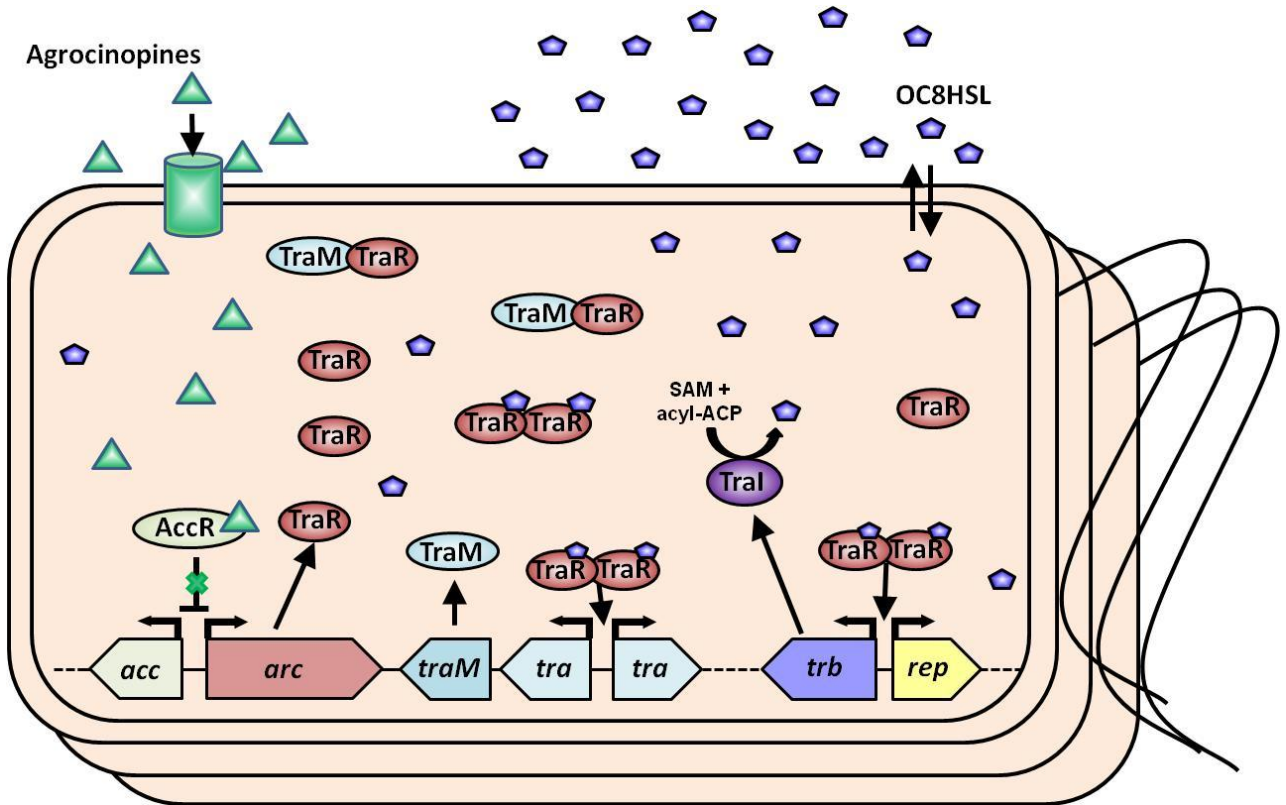
Lorsqu'une plante est blessée, elle synthétise et libère dans la rhizosphère des composés phénoliques telle que l'acétosyringone qui attirent les agrobactéries par chimiotactisme vers la zone de blessure. Celles-ci pénètrent l'espace intercellulaire des tissus blessés, et adhèrent aux cellules végétales. Les composés phénoliques et les monosaccharides relargués par la plante induisent l'expression des gènes *vir* indispensables à la virulence. Ces gènes *vir* sont ainsi impliqués en particulier dans la formation du *pilus*-T, un système de sécrétion de type IV nécessaire au transfert de l'ADN-T vers le noyau de la cellule végétale. L'ADN-T est ensuite intégré dans le génome nucléaire de la plante. Ce transfert de l'ADN-T de la bactérie à la plante constitue un des fondements des biotechnologies végétales pour la construction d'organismes génétiquement modifiés. Dans les cellules végétales transformées, l'expression de l'ADN-T conduit à une synthèse incontrôlée des régulateurs de croissance, les hormones végétales de type auxine et cytokinine, aboutissant à la formation de tumeurs.

#### 1.4.2.1.1 Régulation QS

*A. tumefaciens* C58 constitue l'un des modèles de signalisation *quorum sensing* les plus étudiés. Cette bactérie possède sur son pTi un système TraI/TraR homologue à LuxI/LuxR. *A. tumefaciens* C58 produit et perçoit la N-3-oxo-octanoyl homoserine lactone (3OC8HSL) comme molécule signal (Hwang *et al.*, 1994, Piper *et al.*, 1993). *A. tumefaciens* C58 possède également dans son génome 4 gènes homologues à *luxR* sans que la présence des gènes *luxI* correspondants n'aie été identifiée (Goodner *et al.*, 2001 ; Wood *et al.*, 2001).

#### 1.4.2.1.2 Le système TraI/TraR

Après transfert de l'ADN-T dans le génome de la plante, celle-ci va synthétiser les produits des gènes portés par l'ADN-T dont les opines. Certaines opines, sont requises pour la synthèse de 3OC8HSL (Piper *et al.*, 1999). En effet, chez *A. tumefaciens* C58, les agrocinopines A et B induisent la transcription des opérons *tra* et *trb* (Beck von Bodman, 1992). Le gène *traI* codant pour une protéine de 211 acides aminés se situe sur l'opéron *trb* du pTi. La transcription de l'opéron *trb* dépend de l'activateur TraR, deuxième composante du système TraI/TraR. La protéine TraR de 234 acides aminés est codée par le gène *traR* situé sur l'opéron *arc* du pTi. TraR est tout d'abord le récepteur des signaux NAHL produits par



**Figure 7** : Régulation *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

Les opines produites par la plante après transfert de l'ADN-T rentrent dans la cellule bactérienne *via* des ABC-transporteurs spécifiques puis interagissent avec le répresseur transcriptionnel AccR, ce qui permet de lever la répression des opérons *acc* et *arc*. Les agropinopines sont assimilées par les bactéries via l'opéron *acc*. A forte densité cellulaire, la protéine TraR, codée par l'opéron *arc*, se lie à la 3oxoC8-homosérine lactone (OC8HSL), le signal QS produit par TraI. Le complexe TraR/OC8HSL active la transcription des opérons *rep*, *tra* et *trb*, respectivement impliqués dans les fonctions de réplication végétative et de transfert conjugatif du plasmide Ti. De plus, l'opéron *trb* contenant le gène *traI*, le complexe TraR/OC8HSL induit une augmentation de la synthèse des signaux QS.

*Agrobacterium tumefaciens* C58 mais c'est aussi un régulateur transcriptionnel activant l'expression des gènes cibles du QS (Qin *et al.*, 2000 ; Zhu et Winans, 1999). A forte densité cellulaire, les signaux QS atteignent une concentration seuil et sont alors perçus par les récepteurs TraR. Le complexe TraR/3OC8HSL va se fixer à la boîte *tra*, séquence spécifique de 18 pb et activer ainsi les gènes régulés par QS (Figure 7). La protéine TraR en absence de 3OC8HSL est très instable. La formation du complexe avec la 3OC8HSL permet de réduire considérablement la sensibilité de TraR à la protéolyse (Zhu et Winans, 1999). De plus, la sensibilité de TraR pour la 3OC8HSL est très forte puisque 1 à 2 nM de la molécule signal suffisent à induire la formation du complexe et donc l'activation des fonctions régulées par QS. La régulation QS est cependant différente des autres systèmes homologues et les fonctions régulées bien distinctes (voir ci-dessous).

#### 1.4.2.1.3 Les régulateurs transcriptionnels associés

La signalisation QS est contrôlée à un niveau supérieur par des régulateurs transcriptionnels. L'expression de TraR est induite soit par une levée de répression, soit par une activation. Chez les souches induisant la production d'agrocinopines dans les tumeurs, telle C58, le régulateur AccR contribue à la répression du système de régulation QS. AccR est proche de la famille des répresseurs DeoR. Le répresseur AccR réprime l'expression de l'opéron *acc* impliqué dans le transport et le catabolisme des opines et celle de l'opéron *arc*, comprenant le gène *traR*. En présence d'agrocinopine, par exemple dans la tumeur, la répression par AccR est levée et la transcription des gènes des opérons *acc* et *arc*, et donc celle de *traR* sont induites (Figure 7). Les agrocinopines, en se fixant à AccR diminuerait drastiquement l'affinité d'AccR pour la séquence promotrice de l'opéron *acc*. L'expression du régulateur transcriptionnel TraR est donc inhibée par le répresseur AccR en absence d'opines. Chez les souches induisant la production d'octopine dans les tumeurs, des activateurs transcriptionnels de la famille LysR tels que OccR induisent, en présence d'octopine, l'expression de l'opéron *occ* sur lequel est présent le gène *traR* ainsi que les gènes impliqués dans l'assimilation de l'octopine. (Wang *et al.*, 1992 ; Cho *et al.*, 1996).

Par ailleurs, il existe chez C58 un régulateur nommé TraM, aussi présent chez les bactéries du genre *Rhizobium*, possédant des systèmes de conjugaison TraR - dépendants (Ramirez-Romero *et al.*, 1997). La fixation de TraM sur TraR de manière stable empêche TraR de se lier à l'OC8HSL et donc de se fixer à la boîte *tra* pour activer la transcription des opérons *tra*, *trb* et *rep* (Hwang *et al.*, 1999). L'affinité de TraM pour TraR est très forte et de



l'ordre du nanomolaire (Swiderska *et al.*, 2001). L'expression de TraM est inductible par l'acétylsyringone, produite par les plantes en conditions de stress (Cho et Winans, 2005). Dans les phases précoces de l'interaction *A. tumefaciens* – plante hôte, l'acétylsyringone induit l'expression des gènes *vir* et donc le système de sécrétion de type IV nécessaire au transfert de l'ADN-T. L'opéron *tra* porte des gènes qui codent également pour un système de sécrétion de type IV nécessaire au transfert du pTi d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. L'inhibition de TraR *via* l'activation de TraM par l'acétylsyringone permet d'éviter l'expression de deux systèmes de sécrétion de type IV simultanément. TraM inhibe l'activation précoce des fonctions régulées par QS ; à forte densité cellulaire, la quantité de récepteurs TraR compense l'action de TraM et les fonctions QS sont exprimées (Figure 7).

Un mutant *accR* surproduit de l'OC8HSL car l'expression de TraR n'est plus réprimée et l'expression de l'opéron *tra* est alors induite. Ce mutant peut également transférer son pTi en absence d'opines car leur présence n'est plus nécessaire pour lever la répression sur TraR. Un mutant *traM* peut transférer son pTi en absence d'opines, la présence de l'autoinducteur reste cependant nécessaire à l'activation des gènes *tra*. Ce mutant est néanmoins plus sensible aux NAHL, la concentration minimale nécessaire pour activer les gènes *tra* étant inférieure à celle de la souche sauvage. Ces régulateurs jouent donc un rôle important dans le contrôle de la signalisation et l'optimisation de l'expression des fonctions bactériennes régulées par QS lors de l'interaction avec la plante hôte.

#### 1.4.3 Fonctions régulées

Chez *A. tumefaciens*, les processus régulés par QS sont le contrôle du nombre de copies du pTi ainsi que l'agressivité sur plante hôte, et la conjugaison (Figure 7).

##### 1.4.3.1 Réplication du pTi

Un des processus régulés par le système TraI/TraR est le contrôle du nombre de copies du pTi (Li *et al.*, 2000). Chez C58 en culture, le pTi est maintenu de façon stable, et en une seule copie par génome. L'opéron *repABC*, adjacent à l'opéron *trb*, est responsable de la réplication du pTi et de son hérité stable. Les protéines RepB et RepC sont en effet requises pour une hérité stable du pTi. Les gènes de la région *rep* appartiennent par ailleurs à une famille de réplicateurs présents notamment chez les plasmides à faible nombre de copies de la famille des *Rhizobiaceae* (Cevallos *et al.*, 2002, Turner et Young, 1995). La présence de signaux QS augmente l'expression de *repA* bien que la transcription des gènes *rep* ne dépende





pas entièrement de la régulation QS. En effet la maintenance et la partition du plasmide se fait continuellement même lorsque TraR est inactif (Pappas et Winans, 2003). Cependant il a été montré que l'acétylsyringone produite par la plante en début d'infection active les gènes *vir* qui vont à leur tour activer les opérons *tra* (Cho et Winans, 2005). Le complexe TraR/OC8HSL stimule alors l'expression de *rep* ce qui conduit à une augmentation du nombre de copies du pTi, jusqu'à 7 à 8 par génome (Pappas et Winans, 2003). Une mutation dans AccR, le répresseur de *traR*, entraîne également une élévation du nombre de copie du pTi (Li et Farrand, 2000).

#### 1.4.3.2 Le niveau d'agressivité sur plante hôte

L'augmentation du nombre de copie du pTi entraîne la présence d'un plus grand nombre de composants du système de perception des opines mais aussi d'ADN-T et des gènes liés à la virulence. La signalisation QS de part l'induction de l'expression de l'opéron *repABC* serait ainsi un facteur augmentant l'agressivité d'*A. tumefaciens* (Pappas *et al.*, 2003 ; Chevrot *et al.*, 2006). Chez un mutant de la souche à octopine R10 surexprimant TraR, le nombre de copies du pTi augmente et cela conduit à l'apparition de tumeurs (sur rondelles de carottes) en nombre plus élevé (Pappas *et al.*, 2003).

#### 1.4.3.3 La conjugaison du pTi

##### 1.4.3.3.1 Le mécanisme de conjugaison et sa régulation

La signalisation QS chez *Agrobacterium tumefaciens* C58 contrôle également le transfert conjugatif du pTi. Chez les procaryotes, dont la reproduction est asexuée, le transfert horizontal entre bactéries permet d'acquérir de nouveaux caractères comme la virulence et la résistance à des antibiotiques ou à des métaux lourds. La propagation d'un caractère peut se faire très rapidement et ce mécanisme de transmission de plasmides, appelé aussi conjugaison, est responsable d'une grande partie de la diversité génétique microbienne. La conjugaison fait intervenir un système de sécrétion de type IV impliquant la formation du *pilus*-T, sa stabilisation et le transfert du pTi d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice *via* cette structure formée (Lawley *et al.*, 2003). Chez les *Rhizobiaceae*, le système de conjugaison est généralement codé par les gènes *tra* et *trb* dont l'expression est activée par TraR. Le cluster *tra* contient l'origine de transfert (*oriT*) entre les deux opérons divergents *traAFB* et *traCDG*. L'opéron *tra* est impliqué dans la synthèse du système de sécrétion de type IV et l'opéron *trb* dans le transfert du pTi entre deux bactéries. Cet opéron contient 11 gènes dont *traI*,

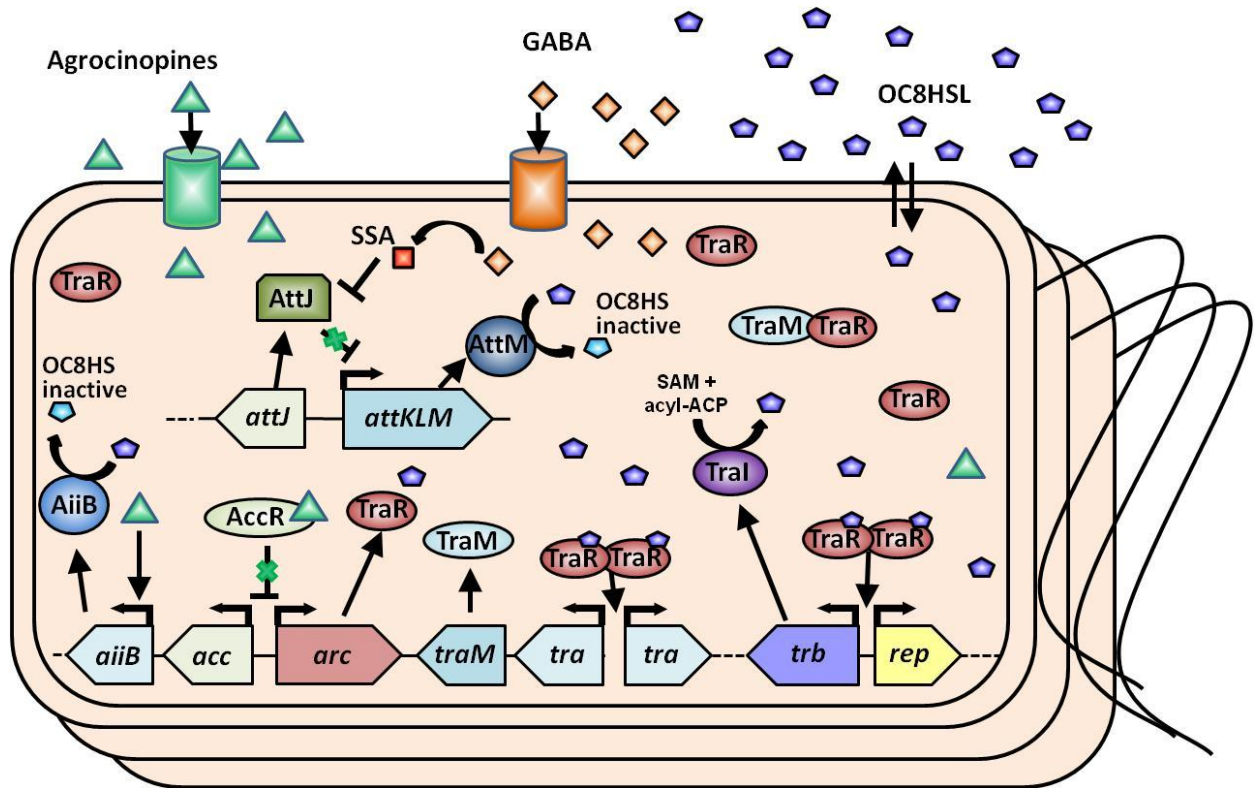


responsable de la synthèse des NAHL. Neuf des 11 gènes sont nécessaires au processus de conjugaison (Li *et al.*, 1999). Ils sont impliqués dans l'assemblage de l'appareil conjugatif servant au transfert du pTi d'une bactérie à une autre. Dans la tumeur, les agrocinopines synthétisées permettent de lever la répression d'AccR sur TraR. Lorsque la concentration en NAHL atteint la concentration seuil, le complexe TraR/OC8HSL active les opérons *tra* et *trb* codant les protéines nécessaires au mécanisme de conjugaison (Figure 7).

#### 1.4.3.3.2 Incompatibilité des plasmides

Les plasmides codent généralement pour des protéines qui bloquent l'entrée d'un plasmide identique ou proche dans une même bactérie. Ce mécanisme est connu comme l'exclusion d'entrée. De plus, la synthèse du système de sécrétion de type IV est un processus très coûteux en énergie pour la bactérie, il est donc compréhensible qu'il existe des systèmes de régulation de la conjugaison, elle-même coûteuse en énergie, pour éviter le transfert de plasmide entre deux donatrices. Pour cela, deux systèmes d'exclusion existent. Le premier est le système d'exclusion de surface. Une bactérie, lorsque qu'elle possède un plasmide, présente des protéines à la surface de sa membrane externe dont l'affinité au *pilus* de conjugaison est plus forte que celle présentée pour les protéines nécessaires à l'initiation de la conjugaison. L'attachement du *pilus* à ces protéines interrompt le processus de transfert du pTi. Le second système est l'exclusion d'entrée. La protéine TraS du plasmide F d'*E. coli* ou la lipoprotéine TrbK du pTi sont localisées au niveau de la membrane interne et vont inhiber la conjugaison en bloquant le passage des signaux envoyés par la bactérie donatrice (Haase *et al.*, 1996). L'opéron *trb* du pTi contient les gènes *trbJ* et *trbK*. Cet opéron étant régulé par QS, les gènes *trbJ* et *trbK* ne sont exprimés qu'à forte densité cellulaire. A faible densité, les cellules bactériennes ne présentent pas de protéines d'exclusion sur leur membrane et sont donc toutes de potentielles receveuses (Cho *et al.*, 2009).

Les bactéries du genre *Agrobacterium*, dont la grande majorité ne possède pas le pTi, représentent près de 1% des populations bactériennes rhizosphériques totales. De plus, le pTi est non seulement transmissible à d'autres *Agrobacterium* mais aussi à des *Rhizobiaceae* comme *Rhizobium* et *Sinorhizobium* ou d'autres genres bactériens tels que *Phyllobacterium* ; ces bactéries constituent ainsi un réservoir de bactéries réceptrices. L'acquisition du pTi peut dans certains cas conférer la capacité de virulence à la bactérie receveuse (Teyssier-Cuvelle *et al.*, 2004).



**Figure 8** : Dégradation des signaux *quorum sensing* chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

Les opines produites par la plante après transfert de l'ADN-T active la transcription du gène *aaiB* codant pour la lactonase AiiB qui dégrade les signaux OC8HSL. L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) produit par la plante en condition de stress rentre dans les cellules bactériennes *via* des ABC-transporteurs spécifiques et est transformé en aldéhyde semi-succinique (SSA) qui permet de lever la répression par AttJ sur l'opéron *attKLM*. La protéine AttM synthétisée va dégrader l'OC8HSL.

La co-existence de plusieurs plasmides est néanmoins tout à fait possible. Chez des bactéries du genre *Rhizobium*, plusieurs plasmides sont présents. De même, *Agrobacterium tumefaciens* C58 possède le plasmide At en plus du pTi. Le pAt est également conjugatif, mais en présence du pTi, l'efficacité de transfert du pAt est 10 fois inférieure (Chen *et al.*, 2002). Par ailleurs, des souches d'*Agrobacterium* peuvent porter des plasmides Ti différents.

#### 1.4.4 Dégradation des signaux QS chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

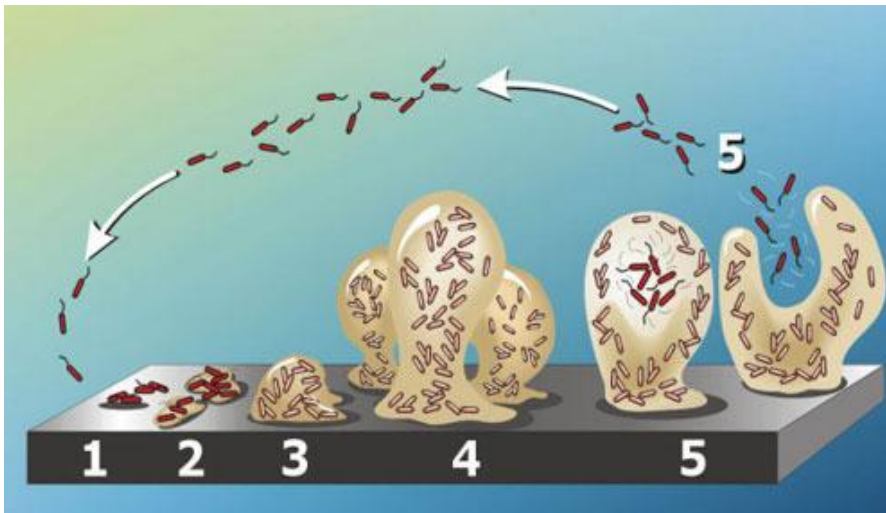
*A. tumefaciens* C58 présente la particularité de posséder deux lactonases, AttM et AiiB, qui ont la capacité de dégrader les signaux QS par ouverture du cycle lactone de la molécule d'OC8HSL. L'expression de ces deux lactonases induit une modification du pool intra et extracellulaire de molécules signal disponibles pour les bactéries et ainsi module les fonctions régulées par QS.

##### 1.4.4.1 AttM

La lactonase AttM fait partie de l'opéron *attKLM*, situé sur le plasmide At, et dont l'expression est contrôlée par le régulateur transcriptionnel AttJ localisé en amont de l'opéron et inversement orienté. Cet opéron est impliqué dans la voie d'assimilation de la  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) et du  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) (Carlier *et al.*, 2004). Le rôle de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), produit en forte quantité en condition de stress biotique ou abiotique, a été mis en évidence dans l'induction de l'opéron *attKLM* (Chevrot *et al.*, 2006). Le GABA dans la cellule bactérienne est converti en semi-aldéhyde succinique (SSA) qui lève la répression d'AttJ et donc active la transcription de l'opéron et par conséquent induit la dégradation des signaux QS (Figure 8). AttM est retrouvé dans de nombreuses souches d'*Agrobacterium* (Haudecoeur *et al.*, 2009a ; Khan et Farrand, 2009). La forte fréquence d'*attM* dans les populations d'agrobactéries pourrait s'expliquer, entre autre, par l'implication de l'opéron *attKLM* dans la détoxification de molécules produites par les plantes comme le SSA ou le GHB.

##### 1.4.4.2 AiiB

La protéine AiiB est codée par un gène du pTi sur lequel sont également présents les gènes du système TraI/TraR (Carlier *et al.*, 2003). Chez un mutant *aaiB*, l'accumulation d'OC8HSL est plus forte. Il a été montré que l'expression de la lactonase AiiB est induite par les agrocinopines A et B (Figure 8) (Haudecoeur *et al.*, 2009a). Dans cette souche, les agrocinopines induisent donc la production et la dégradation des signaux QS. L'occurrence de



**Figure 9** : Formation de biofilm chez les bactéries

Le schéma représente les cinq étapes du développement du biofilm. Etape 1: attachement initial des cellules à une surface. Etape 2 : production de lipopolysaccharides qui permet une adhésion très forte et quasi irréversible. Etape 3 : développement précoce de l'architecture en biofilm. Etape 4 : maturation du biofilm. Etape 5 : dispersion de cellules individuelles à partir du biofilm (Reproduit de Stoodley *et al.*, 2002).

la lactonase AiiB dans une rhizosphère de tabac est beaucoup plus rare que celle de la lactonase AttM ; cela est corrélé avec la faible proportion d'agrobactéries virulentes portant le pTi.

La régulation de l'expression de ces lactonases par des signaux de plantes souligne l'importance pour la plante et la bactérie d'optimiser les conditions de l'interaction. La communication bactérienne chez *A. tumefaciens* C58 est bien plus complexe que celle de *Vibrio fischeri* et les fonctions régulées diverses. Chez cette bactérie, la dégradation enzymatique des signaux QS ajoute un niveau de régulation supplémentaire à cette signalisation QS.

### 1.5 QS chez *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont ubiquistes et appartiennent aux  $\gamma$ -protéobactéries. Ce genre bactérien regroupe des espèces saprophytes comme *Pseudomonas fluorescens* ou *P. putida*, des phytopathogènes telle que *P. syringae*, ou des espèces pathogènes opportunistes d'animaux comme *P. aeruginosa*. De nombreux gènes de virulence régulés par QS ont été identifiés. La régulation QS chez *P. aeruginosa* est une des plus étudiée.

#### 1.5.1 *Pseudomonas aeruginosa* et son pouvoir pathogène

*P. aeruginosa* est une bactérie opportuniste responsable de diverses infections notamment chez des personnes immunodéprimées ou atteintes de mucoviscidose (Govan et Deretic, 1996). Des *P. aeruginosa* ont été isolés dans divers environnements comme l'eau ou la rhizosphère. Cette bactérie peut infecter de nombreux hôtes et son mode d'infection implique des facteurs de virulence extracellulaires dont l'expression est soumise à une régulation QS (Van Delden et Iglewski, 1998).

A forte densité cellulaire, la production d'enzymes extracellulaires comme des élastases et des protéases induit la destruction des tissus de l'hôte constitués notamment d'élastine et de collagène pour les cellules animales. Parmi les sécrétions de *Pseudomonas aeruginosa*, se trouvent également des toxines de type pyocyanine qui représentent des facteurs de virulence important dans le cas de maladies des voies respiratoires. Durant l'infection, cette bactérie se développe en biofilm (Figure 9). Dans un biofilm, les bactéries adhèrent à une surface qui peut être d'origine inorganique comme des tuyaux de plomberie, des cathéters, ou organique, comme les cellules des hôtes eucaryotes. Le biofilm regroupe de nombreuses cellules





bactériennes adhérentes entre elles par sécrétion de protéines d'adhésion et d'une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de lipides, de protéines et d'acides nucléiques. Lorsque les bactéries adoptent une telle organisation, certaines fonctions biologiques sont modulées ; par exemple, la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas* augmente considérablement lorsque la population est structurée en biofilm (Costerton *et al.*, 1999). Le biofilm permet aussi l'accumulation de bactéries dans un espace restreint favorisant la communication bactérienne (Davey et O'Toole, 2000).

### 1.5.2 Régulation du QS

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes QS homologues à LuxR/LuxI ont été découverts : LasR/LasI et RhlR/RhII. La protéine LasI est responsable de la synthèse de la 3-oxo-C12HSL (3OC12HSL) reconnue par LasR tandis que RhII permet la production de la C4HSL reconnue par RhlR (Pearson *et al.*, 1995). LasR n'interagit pas avec la C4HSL ni RhlR avec la 3OC12HSL. Il y a donc une spécificité du récepteur pour le substrat qui lui est associé. Les systèmes sont cependant liés entre eux. En effet, le complexe LasR /3OC12HSL régule la transcription de *rhlR* (Latifi *et al.*, 1996 ; Pesci *et al.*, 1997). A forte densité cellulaire, les complexes LasR/ 3OC12HSL et RhlR / C4HSL activent la transcription de différents gènes tels que les gènes *las* qui codent des élastases. Ces complexes induisent également l'expression des gènes *lasI* et *rhlI*, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif et aboutissant à l'augmentation de la production de NAHL.

En plus de LasR et RhlR, deux autres protéines régulatrices de type LuxR ont été découvertes chez *P. aeruginosa*. Le gène *vqsR* (*Virulence and quorum sensing Regulator*) code un régulateur transcriptionnel (Juhas *et al.*, 2004). En présence de 3OC12HSL, LasR interagit avec la boîte *las* de la région promotrice de *vqsR* et active son expression (Li *et al.*, 2007). VqsR est un régulateur positif de LasI ; l'inactivation de la protéine VsqR abolit la production de NAHL. Le second est le régulateur QscR dont l'expression est indépendante de LasR (Chugani *et al.*, 2001). Des études transcriptomiques du mutant hypervirulent *qscR* montrent que *lasI* et *rhlI* sont exprimés plus précocement. Au total, la protéine QscR régule positivement ou négativement l'expression de plus de 400 gènes (Lequette *et al.*, 2006). A faible concentration de NAHL, QscR peut former un hétérodimère avec LasR et RhlR ce qui empêche la fixation des NAHL sur les récepteurs LasR et RhlR et donc inhibe l'activation des fonctions régulées par QS comme l'augmentation de la production de NAHL (Ledgham *et al.*, 2003).



D'autres systèmes de régulation modulent la régulation QS chez *P. aeruginosa* notamment le système à deux composantes GacA/GacS. Il comprend un senseur ancré dans la membrane cytoplasmique et un régulateur transcriptionnel. Le système GacA/GacS qui régule la synthèse d'enzymes extracellulaires ou de métabolites secondaires lors d'interactions plante-bactérie est présent chez de nombreuses *proteobacteria* (Heeb et Haas, 2001). Chez *Pseudomonas*, ce mécanisme représente un système de régulation majeur de la virulence. Cependant, les stimuli auxquels réagit le senseur ne sont pas encore bien connus.

GacA régule positivement l'expression de QscR, le répresseur transcriptionnel de *lasI* et *rhlI* (Ledgham *et al.*, 2003). De plus, l'autre système QS présent chez *Pseudomonas* impliquant le *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), intervient dans la régulation QS. La synthèse de PQS dépend du complexe LasR/3OC12HSL et il a été montré que le PQS est impliqué dans la régulation de *lasB* et de *rhlI* (McKnight *et al.*, 2000). Le système *pqs* est régulé positivement par le système *las* mais il est également régulé négativement par le système *rhl* (Pesci *et al.*, 1997 ; Wade *et al.*, 2005).

De plus, une surexpression du système de pompe à efflux, responsable de l'export des précurseurs des PQS, abolit l'activation des fonctions QS (Lamarche *et al.*, 2011). Les conditions de stress et de carence sont des facteurs qui influent également sur cette régulation QS. Les deux systèmes QS chez *P. aeruginosa* sont donc intimement interconnectés et de nombreux facteurs influent sur la régulation QS.

### 1.5.3 Fonctions régulées

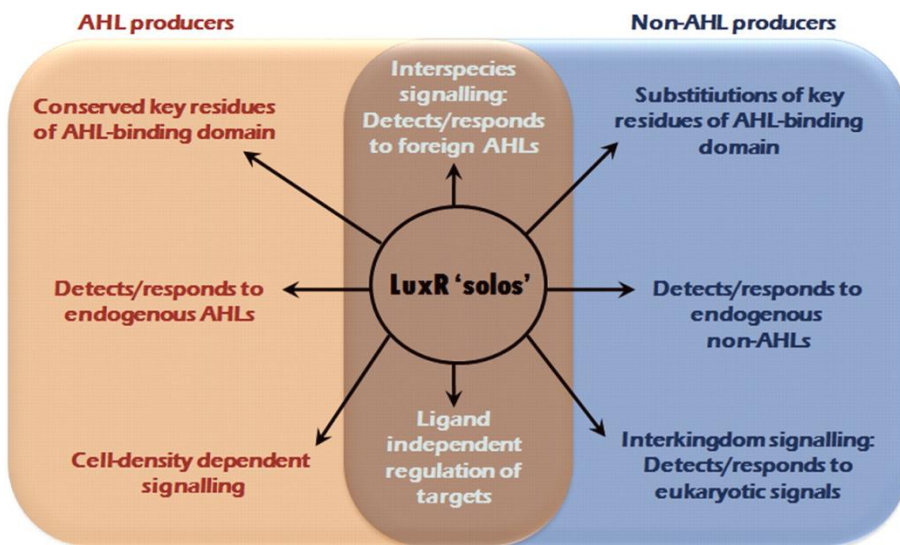
Les complexes LasR/3OC12HSL et RhIR/C4HSL modulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la pathogénie ou la survie de la bactérie (Rumbaugh *et al.*, 2000). Chez *P. aeruginosa*, les systèmes *las* et *rhl* régulent près de 10% des gènes du génome (Schuster *et al.*, 2003). Selon une étude protéomique, 24% des protéines détectées sont régulées par QS (Arevalo-Ferro *et al.*, 2003). Le QS est impliqué dans la régulation de processus tels que la production d'élastase, de protéases diverses, de sidérophores, de la différenciation du biofilm et la production de NAHL. Un mutant déficient pour la signalisation QS est moins virulent. Parmi les gènes identifiés comme étant régulés par QS, 7% possèdent en amont une boîte *las*, appelée *lux* chez *Vibrio fischeri* (Wagner *et al.*, 2003). La régulation se fait de manière différente selon les gènes, en termes d'activation ou de répression, et selon le moment dans l'interaction avec l'hôte (Schuster *et al.*, 2003).



#### 1.5.4 Emergence des tricheurs

La communication QS permet de synchroniser à l'échelle d'une population bactérienne des fonctions comme la production de protéases, de sidérophores ou d'antibiotiques. Cela permet d'optimiser la croissance des bactéries mais aussi d'assurer leur survie dans l'environnement. Cette coopération bactérienne est basée sur des exoproduits qui représentent un bien commun ou « *public good* ». Le bien commun est défini comme un produit dont la production est coûteuse en énergie mais qui confère un avantage à tous les individus de la population (Frank, 1998). Cependant, une population qui présente un comportement coopératif peut être soumise à une invasion par des tricheurs ne produisant pas le bien commun mais qui bénéficient des avantages procurés par celui-ci, sans être affectés par le coût de production de ce bien commun, contrairement aux cellules coopératrices (West *et al.*, 2006). Ces notions peuvent être appliquées au cas de *P. aeruginosa*, chez lequel le QS contrôle notamment l'expression d'élastases, enzymes indispensables pour assimiler l'élastine des cellules eucaryotes. Les élastases produites sont sécrétées dans le milieu extracellulaire ce qui permet alors à des tricheurs potentiels de disposer d'élastine pour leur croissance, sans produire les enzymes nécessaires à leur assimilation.

L'idée que les bactéries coopèrent a conduit à de nouvelles questions concernant l'évolution de la communication bactérienne, telles que quel est le coût à payer pour cette communication, comment ce comportement de coopération est maintenu dans les populations, comment l'exploitation du système par des tricheurs est contrôlée ? Plusieurs études sur les comportements coopératif et tricheur ont été menées dans ce sens chez *P. aeruginosa* dont de nombreux isolats provenant d'environnements cliniques ou naturels présentent des caractéristiques anormales de régulation du QS (Denervaud *et al.*, 2004 ; Kohler *et al.*, 2009). La majorité des mutants caractérisés ne répondent plus à la molécule signal, d'autres sont mutés uniquement au niveau de la synthèse. Dans les deux cas, ces mutants sont assimilés à des tricheurs ; ils bénéficient de l'action coopérative des bactéries voisines. Des mutants co-inoculés avec des bactéries sauvages, en milieu minimum supplémenté en élastine nécessitant la production d'élastases dont l'expression est régulée par QS pour croître, voient leur proportion augmenter de <5% à >40% en 48h (Diggle *et al.*, 2007). Cependant, quand la proportion de tricheurs dans la population est trop élevée, la production d'enzymes nécessaires à l'assimilation des nutriments diminue. Les ressources deviennent alors un facteur limitant de croissance et la fitness des tricheurs diminue. Cela semble être un moyen d'équilibrer les populations de coopérateurs et de tricheurs qui co-existent dans la nature.



**Figure 10** : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des récepteurs LuxR-solos chez des protéobactéries.

Certaines propriétés des LuxR-solos sont propres à chacun des deux types de bactéries productrices ou non de AHLs ; d'autres sont partagées dans les deux situations (Reproduit de Subramoni et Venturi, 2009).

Le maintien des populations coopératives dans la nature s'expliquerait également par la sélection de parentèle (Hamilton, 1964). Cette théorie prédit que si les individus avoisinants d'un autre individu sont proches génétiquement, alors il est dans l'intérêt de cet individu de coopérer car même si l'individu voisin se multiplie mieux, la descendance sera tout de même proche génétiquement du premier individu. Cette théorie basée sur la reconnaissance des proches pourrait s'appliquer aux comportements coopératifs chez les bactéries et donc à la régulation QS qui permet de détecter les individus proches car utilisant la même molécule signal. De plus, ces organismes ayant une reproduction clonale, les individus au sein d'un espace réduit sont génétiquement identiques. La communication QS serait alors favorisée et les bactéries coopératrices sélectionnées. Cependant, dans une population hétérogène, comme lors d'infection de patients humains par *Pseudomonas* où l'on peut identifier quelques lignées différentes, la compétition entre les bactéries aboutit à l'apparition de tricheurs présentant des mutations dans le système QS (Diggle *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2006).

#### 1.6 Communication inter-espèces et perturbation de la régulation QS dans la rhizosphère

L'apparition du système QS semble ancestrale dans de nombreuses espèces bactériennes. Des événements de transferts horizontaux, duplications, ou pertes peuvent être observés dans plusieurs cas. Au sein des protéobactéries, près de 70 espèces possédant au moins un système homologue à LuxI/LuxR ont été identifiées (Case *et al.*, 2008). De nombreuses espèces ne présentent cependant pas toujours l'homologue à LuxI, partenaire du récepteur LuxR, ce qui n'exclut pas pour certaines bactéries de pouvoir synthétiser des NAHL, de par la présence d'autres systèmes homologues dans leur génome. Par exemple, chez *Sinorhizobium meliloti* qui présente plusieurs systèmes QS dont SinI/SinR, le récepteur solo ExpR régule la fixation d'azote et le transport des métaux en réponse aux signaux produits par les autres systèmes QS (Hoang *et al.*, 2004 ; McIntosh *et al.*, 2008). Ces homologues de LuxR, dont l'absence du partenaire LuxI a été observée, ont été nommés « orphelins » (Fuqua, 2006) ou « solos » (Subramoni et Venturi, 2009) ; ils présentent tous en N-terminal le domaine de liaison aux NAHL et en C-terminal, le domaine de liaison à l'ADN. Les bactéries possédant un système LuxR-solo peuvent donc percevoir les NAHL produites par d'autres bactéries voisines ou *via* d'autres systèmes QS dans leur génome (Figure 10). Des bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* ont été identifiées à partir de prélèvements effectués chez un patient atteint de mucoviscidose. Il a été montré que la virulence de *Burkholderia* est augmentée en réponse aux NAHL produites par *Pseudomonas* (McKenney *et al.*, 1995). La présence d'homologues à LuxR dans *Burkholderia* permet de lui indiquer la





présence d'autres bactéries produisant ces signaux et de moduler certaines fonctions en conséquence. C'est un exemple de communication croisée ou *cross talk*.

On estime à 20% le nombre de protéobactéries possédant un système LuxR-solo et ne synthétisant pas de NAHL. Par exemple, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* qui ne produisent pas de NAHL possèdent un homologue à LuxR nommé SdiA qui permet de réguler l'expression de gènes cibles *via* des NAHL exogènes perçues par le récepteur (Ahmer, 2004).

La présence de LuxR solo d'une part, la capacité de produire un ou plusieurs types de NAHL par les protéines homologues à LuxI et celle des récepteurs homologues à LuxR à percevoir un ou plusieurs types de signaux d'autre part mettent en évidence les possibilités de communication inter-espèces. Les différents systèmes QS homologues à LuxI/LuxR pourraient permettre de cloisonner différents niveaux de communication: intra-espèces mais aussi inter-espèces. En effet, la plupart des molécules signal sont spécifiques d'un groupe ou d'une espèce, mais certaines bactéries appartenant à des groupes bactériens différents partagent également le même signal QS, ce qui peut permettre ainsi la communication croisée. Cette propriété d'activer les fonctions d'une bactérie par les signaux QS d'une autre constitue la base des systèmes senseurs pour détecter les molécules de NAHL. Certaines souches bactériennes ont été modifiées pour ne plus produire de signaux NAHL. L'apport exogène de différentes NAHL provenant de milieux de culture d'autres bactéries active les fonctions de ces souches bioindicatrices qui présentent un phénotype marqué comme la production de pigment violet chez *Chromobacterium violacearum* (McClellan *et al.*, 1997).

Le récepteur SdiA d'*E. coli* reconnaît différents types de NAHL mais il a été aussi montré que l'indole, produit naturellement par *E. coli*, module l'expression de gènes régulés *via* SdiA (Lee *et al.*, 2007). Certains récepteurs homologues à LuxR présentent donc des mutations dans le site de fixation du ligand leur conférant la capacité de lier différentes NAHL mais aussi des composés autres que des NAHL. C'est également le cas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* dont le récepteur XccR homologue à LuxR interagit avec des composés de plantes, encore non identifiés, afin de contrôler les fonctions de virulence (Zhang *et al.*, 2007). Les organismes eucaryotes peuvent donc aussi intervenir dans la régulation QS. Ainsi, il a été montré que les NAHL, structurellement proches des hormones peuvent affecter l'expression de gènes eucaryotes notamment au sein de macrophages ou des cellules cancéreuses (Tateda *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2004). Récemment, une étude a mis en



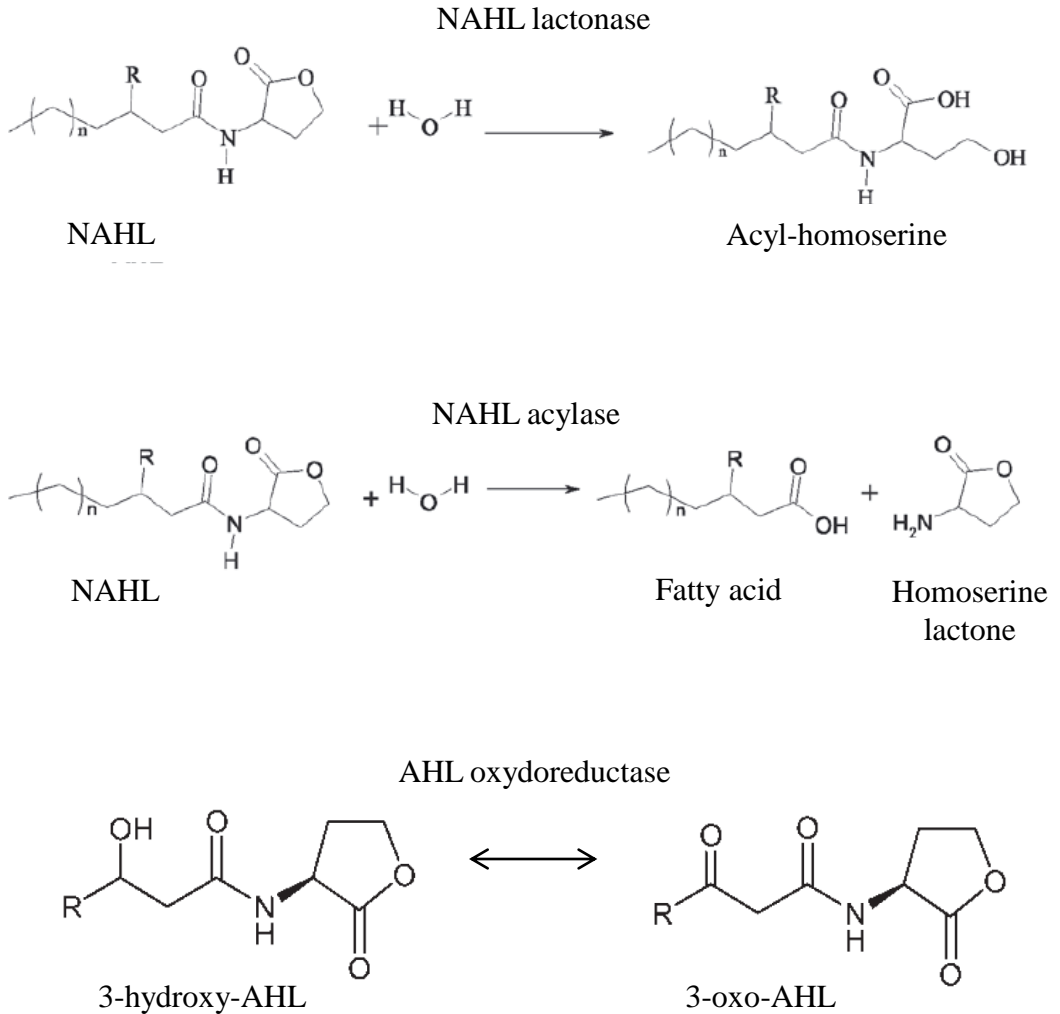
évidence l'interaction des NAHL avec des membranes biologiques au niveau de microdomaines lipidiques (Davis *et al.*, 2010). L'insertion des NAHL dans la membrane modifie le potentiel dipolaire de celle-ci et entraînerait par la suite une cascade de régulation. La signalisation QS peut donc aussi opérer à l'échelle des interactions procaryotes/eucaryotes. Ce mécanisme a été nommé « *inter-kingdom signalling* » pour signalisation inter-règnes (Shiner *et al.*, 2005). Une comparaison protéomique de plants de *Medicago truncatula* cultivés sur milieu MS supplémenté ou non en NAHL a révélé des modifications d'abondance de plus de 150 protéines (Mathesius *et al.*, 2003). Une étude transcriptomique menée chez *Arabidopsis thaliana* sur des feuilles et des racines exposées à des NAHL montre que les NAHL exercent un effet sur la transcription de nombreux gènes liés au métabolisme général et au développement (Von Rad *et al.*, 2008). Les cellules eucaryotes peuvent donc détecter et répondre à la présence de NAHL.

De ce qui précède, on peut conclure que, la signalisation QS est utilisée par les bactéries pour communiquer entre elles, évaluer leur densité et les caractéristiques de diffusion du milieu, et agir de manière synchronisée. Ce mécanisme est assimilé à une collaboration entre bactéries. Il a cependant été démontré que cette signalisation QS peut être soumise à une invasion par des tricheurs. Par ailleurs, la signalisation QS peut également intervenir dans la communication inter-espèces et même inter-règnes. La signalisation QS est souvent impliquée dans le mécanisme de virulence de bactéries, et plusieurs exemples montrent que des signaux de plantes influent sur la signalisation QS. Intervenir dans cette signalisation permettrait aux hôtes eucaryotes de moduler la virulence du pathogène, et d'optimiser ses réactions de défense. De façon remarquable, des eucaryotes possèdent des systèmes permettant de percevoir cette communication, d'y répondre mais aussi de la perturber. Ainsi, des plantes produisent des métabolites secondaires qui peuvent interférer avec la signalisation QS (Teplitski *et al.*, 2000). Pendant le développement végétal, divers composés structurellement proches des NAHL, sécrétés par les racines, rentrent en compétition avec les NAHL pour le récepteur et perturbent ainsi la régulation QS (Gao *et al.*, 2003). Ces molécules, antagonistes du QS, sont appelées *quorum sensing inhibitors* (QSI).

Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que les bactéries mais aussi certaines plantes et animaux ont la capacité de dégrader *via* des enzymes spécifiques les signaux de signalisation QS. La première enzyme de dégradation des NAHL identifiée est la lactonase AiiA chez *Bacillus subtilis* (Dong *et al.*, 2002). Plus récemment, une étude a montré que des plantes de la famille des légumineuses ont également la capacité de dégrader ces signaux QS



(Delalande *et al.*, 2005). Les molécules de la famille des NAHL semblent donc participer à la communication inter-règnes mais la régulation et le rôle de cette signalisation QS dans les interactions procaryotes/eucaryotes restent encore à étudier. Les molécules QSI et les phénomènes de dégradation enzymatique des signaux QS rendent simpliste l'idée que la régulation QS ne reposerait que sur les seules étapes de production et de perception du signal. Il faut en effet ajouter à ces deux étapes, certes essentielles, l'existence de phénomènes de perturbation de la régulation QS (*via* les QSI ou la dégradation des signaux) ainsi que les phénomènes de communication croisée. L'importance écologique du phénomène de dégradation enzymatique des signaux QS par divers organismes justifie qu'il fasse l'objet du second chapitre de cette introduction.



**Figure 11** : Types d'activité enzymatique de dégradation des NAHLs

La dégradation des NAHLs par une enzyme de type lactonase produit de l'acyl homosérine par ouverture du cycle lactone. Les produits de dégradation des NAHLs par l'action d'une acylase sont l'homosérine lactone et un acide gras. L'activité oxydoreductase induit des modifications au niveau des substitutions sur la chaîne d'acide gras comme la transformation du groupe 3-hydroxy en 3-oxo ou inversement.

## 2 Dégradation enzymatique des signaux QS

### 2.1 Principe du *quorum quenching*

Les traitements des infections bactériennes par les antibiotiques sont parfois peu efficaces et aboutissent à l'apparition rapide de résistances. Chez de nombreuses bactéries, la signalisation QS contrôle les processus de virulence lors de l'interaction avec un hôte. Le QS apparaît donc être une cible intéressante pour lutter efficacement contre ces pathogènes. Durant la dernière décennie, plusieurs études ont mis en évidence la capacité de certaines bactéries et de quelques organismes eucaryotes à mettre en place des mécanismes d'inactivation des signaux QS *via* la dégradation des NAHL. Cela offre de nouvelles opportunités de lutte contre les pathogènes dont la virulence est régulée par QS. Le rôle de la dégradation des signaux QS est cependant encore mal compris. De nombreux laboratoires ont donc axé leur recherche sur ces organismes qui dégradent les signaux QS et sur des stratégies ciblant le QS, regroupées sous le terme de *quorum quenching* (QQ) (Dong *et al.*, 2001). Dans cette partie seront présentées les différentes enzymes de dégradation des signaux QS de la famille des NAHL ainsi que des exemples d'études de stratégies de QQ.

### 2.2 Les activités enzymatiques de dégradation des signaux QS

Plusieurs enzymes responsables de l'inactivation des signaux QS ont été identifiées et sont regroupées en trois groupes selon le type d'activité enzymatique : lactonase, acylase et oxydoréductase (Figure 11). Ces enzymes ont été caractérisées chez des organismes bactériens mais aussi eucaryotes (Tableau 1). Dans le cas des NAHL, la dégradation est intracellulaire et la plupart des enzymes identifiées ont une localisation cytoplasmique. En effet, la majorité des souches bactériennes possédant la capacité de dégrader les NAHL ont été isolées à partir d'environnements telluriques ou rhizosphériques dont les caractéristiques physico-chimiques sont très variables. Une activité enzymatique extracellulaire (dépendante des conditions du milieu, de pH et de température) serait probablement de faible efficacité comparée à une activité intracellulaire. Cependant, deux exemples d'activité QQ non cytoplasmiques ont été rapportés dans la littérature : la protéine AiiC responsable de la dégradation des NAHL chez *Anabaena* possède un domaine putatif transmembranaire ce qui supposerait une localisation périplasmique (Romero *et al.*, 2008) et la protéine AhIM de *Streptomyces*, extracellulaire, dont l'activité acylase a été mise en évidence (Park *et al.*, 2005).



**Tableau 1** : Enzymes de dégradation des NAHLs

Protein	Organism	Activity	Protein family	Reference
AiiA	<i>Bacillus subtilis</i>	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Dong <i>et al.</i> , 2000 ; 2002
AiiA	<i>Bacillus</i> sp.	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Lee <i>et al.</i> , 2002 ; Wang <i>et al.</i> , 2004
AiiB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Zhang <i>et al.</i> , 2002 ; Carlier <i>et al.</i> , 2003
AttM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Zhang <i>et al.</i> , 2002
AhlD	<i>Arthrobacter</i> sp.	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Park <i>et al.</i> , 2003
QlcA	Soil metagenome	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Riaz <i>et al.</i> , 2008
QsdR1	<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	lactonase	Metallo-β-lactamase superfamily	Krysciak <i>et al.</i> , 2011
QsdA	<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	lactonase	Phosphotriesterase like lactonase	Uroz <i>et al.</i> , 2008
PPH	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	lactonase	Phosphotriesterase like lactonase	Afriat <i>et al.</i> , 2006
AhlA	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	lactonase	Phosphotriesterase like lactonase	Afriat <i>et al.</i> , 2006
AidH	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	lactonase	α/β hydrolases fold family	Mei <i>et al.</i> , 2010
AiiM	<i>Microbacterium testaceum</i>	lactonase	α/β hydrolases fold family	Wang <i>et al.</i> , 2010
BpiB01	Soil metagenome	lactonase	Hypothetical protein	Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2009
BpiB04	Soil metagenome	lactonase	Glycosyl hydrolase family	Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2009
BpiB05	Soil metagenome	lactonase	Hypothetical protein	Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2011
BpiB07	Soil metagenome	lactonase	Dienelactone hydrolase family	Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2009
DlhR	<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	lactonase	Dienelactone hydrolase family	Krysciak <i>et al.</i> , 2011
nd	<i>Variovorax paradoxus</i>	acylase	nd	Zhang <i>et al.</i> , 2003
AiiD	<i>Ralstonia eutropha</i>	acylase	Ntn hydrolase	Lin <i>et al.</i> , 2003
nd	<i>Comomonas</i> sp. D1	acylase	nd	Uroz <i>et al.</i> , 2005
PvdQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	acylase	Ntn hydrolase	Huang <i>et al.</i> , 2003 ; Sio <i>et al.</i> , 2006
QuiP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	acylase	Ntn hydrolase	Huang <i>et al.</i> , 2006
Aac	<i>Schewanella</i> sp.	acylase	Ntn hydrolase	Morohoshi <i>et al.</i> , 2008
AiiC	<i>Anabaena</i> sp.	acylase	Ntn hydrolase	Kaneko <i>et al.</i> , 2001
AhlM	<i>Streptomyces</i> sp.	acylase	Ntn hydrolase	Park <i>et al.</i> , 2005
nd	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	acylase	nd	Uroz <i>et al.</i> , 2005
nd	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	oxy/red	nd	Uroz <i>et al.</i> , 2005
BpiB09	Soil metagenome	oxy/red	Short-chain deshydrogenase/reductase	Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2011
CYP102A1	<i>Bacillus megaterium</i>	oxy/red	Cytochrome P450	Chowdhary <i>et al.</i> , 2007
PONs	Cellules de mammifères	lactonase	Paraoxonase	Ozer <i>et al.</i> , 2005
nd	Champignon	lactonase	nd	Uroz <i>et al.</i> , 2008
nd	Légumineuses	lactonase	nd	Delalande <i>et al.</i> , 2005

### 2.2.1 Les lactonases

Le premier gène de dégradation des NAHL identifié et caractérisé est le gène *aiiA* découvert chez *Bacillus subtilis* (Dong *et al.*, 2000 ; Molina *et al.*, 2003). Le gène *aiiA* code la protéine AiiA à activité lactonase, responsable de l'ouverture du cycle lactone des NAHL, ce qui rend la molécule inactive. La longueur de la chaîne d'acide gras influe peu sur son activité, c'est pourquoi les lactonases peuvent dégrader différents types de NAHL (Dong *et al.*, 2005). On distingue trois familles distinctes au sein des enzymes de dégradation des NAHL à activité lactonase : les métallo- $\beta$ -lactamases, les phosphotriestérases-like-lactonases et les paraoxonases. La plus représentée est celle des métallo- $\beta$ -lactamases dans laquelle est comprise AiiA.

#### 2.2.1.1 Les métallo- $\beta$ -lactamases

La majorité des enzymes de dégradation des NAHL identifiée à ce jour appartient à la superfamille des métallo- $\beta$ -lactamases, zinc-dépendantes. Les protéines de cette famille présentent toutes un motif conservé de type HxHxDH-H-D-H (Dong *et al.*, 2002). Les résidus impliqués dans ce motif constituent le domaine de liaison au zinc. La structure cristalline de la protéine AiiA a été résolue en présence de 3OC6HSL. Elle révèle la présence de deux atomes de zinc au niveau du site actif. La partie hydrophile de la 3OC6HSL, c'est-à-dire le cycle lactone, est liée au site actif de l'enzyme et la chaîne acyl se positionne dans une poche hydrophobe. Des analyses de modélisation structurale ainsi que l'étude biochimique de formes modifiées sur certains résidus ont mis en évidence que les résidus Tyr194 et Asp108 sont indispensables à l'activité de l'enzyme (Liu *et al.*, 2008). Durant la réaction de lactonolyse, la Tyr194, en interagissant avec le groupe carbonyle (C=O) de la NAHL permettrait la stabilisation du complexe AiiA/C6HSL et l'Asp108 servirait de relais à protons. AiiA hydrolyse différentes NAHL dont la chaîne acyle possède de 4 à 12 carbones, indépendamment des substitutions sur le carbone 3 de cette chaîne.

#### 2.2.1.2 Les phosphotriestérases-like-lactonases (PLL)

La seconde famille de lactonases dégradant les NAHL est appelée phosphotriestérases-like-lactonases (PLL) qui est incluse dans la superfamille des amidohydrolases. Les amidohydrolases, comme les métallo- $\beta$ -lactamases, possèdent des activités hydrolases et sont toutes zinc-dépendantes. Cependant le repliement du site actif des amidohydrolases est constitué d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  contrairement aux métallo- $\beta$ -lactamases uniquement



constitué de feuillets  $\beta$ . La présence des deux types de structure  $\alpha$  et  $\beta$  confère aux PLLs une conformation stable au niveau des résidus catalytiques. La première PLL caractérisée est la protéine QsdA de *Rhodococcus erythropolis* W2 (Uroz *et al.*, 2005) et la première structure obtenue est celle de l'orthologue de QsdA chez l'archéobactérie *Sulfolobus solfataricus* appelée SsoPox (Elias *et al.*, 2008). Les sites actifs d'AiiA et SsoPox présentent des ressemblances. En effet, les résidus Tyr97 et Asp256 de SsoPox jouerait le même rôle que la Tyr194 et l'Asp108 de AiiA. Initialement, l'activité de la SsoPox a été qualifiée de paraoxonase (Merone *et al.*, 2005). En effet, SsoPox possède une activité phosphotriestérase en présence de cobalt ce qui lui confère la capacité de dégrader des arylesters et des organophosphates utilisés en tant qu'insecticides comme le paraoxon. Plus récemment, l'activité lactonase de SsoPox a été mise en évidence. SsoPox dégrade ainsi différentes NAHL comme la N-butyryl homosérine lactone (C4HSL) ou la N-oxo-dodécanoyl homosérine lactone (OC12HSL) mais elle présente une plus forte activité pour les chaînes longues et principalement la N-3-oxo-decanoyl homosérine lactone (3OC10HSL) (Filomena *et al.*, 2011).

#### 2.2.1.3 Les paraoxonases

Les deux premières familles de protéines présentant une activité lactonase sont d'origine bactérienne. Les paraoxonases (PON) constituent la troisième famille ; elles ont été identifiées chez des mammifères (Draganov et La Du, 2004). Ces enzymes hydrolysent également le paraoxon mais aussi de nombreux autres composés. Les PONs adoptent une conformation en feuillets  $\beta$ , au nombre de six, organisés de manière circulaire et formant un tunnel. Cette structure comporte deux atomes de calcium, le premier joue un rôle structural et le second un rôle catalytique. La protéine PON1, purifiée de sérum humain, présente une forte activité de dégradation de la 3OC12HSL produite par *P. aeruginosa* (Ozer *et al.*, 2005). En général, les PONs ont plus d'affinité pour les NAHL à chaînes longues (Chun *et al.*, 2004).

Les trois familles de lactonase ne présentent pas de similarités au niveau des séquences nucléotidiques ou de ressemblances au niveau de la conformation des protéines. La similarité des modes d'action des enzymes dégradant les NAHL de type métallo- $\beta$ -lactamase et PLL pourrait s'expliquer par une convergence évolutive ou une homoplasie, c'est à dire une apparition indépendante d'un même caractère chez des espèces différentes (Elias *et al.*, 2012).



### 2.2.2 Les acylases

Les enzymes à activité acylase coupent les molécules de NAHL au niveau de la liaison amide entre l'homosérine lactone et la chaîne acyl. Ces réactions produisent donc un acide gras et l'homosérine lactone (Leadbetter et Greenberg, 2000). Les produits de dégradation sont la plupart du temps métabolisés et assimilés comme source de carbone ou d'azote. La première acylase caractérisée pour sa capacité à dégrader les NAHL est une protéine provenant de la bactérie *Variovorax paradoxus*. Toutefois, la plus étudiée des acylases est AiiD chez *Ralstonia eutropha* (Lin *et al.*, 2003). La protéine AiiD présente des homologies structurales avec des Ntn hydrolases (*N-Terminal nucleophile*) comme l'aculéacine A acylase d'*Actinoplanes*, ou la céphalosporine acylase. Les Ntn hydrolases ont en commun quatre domaines : un signal peptidique, une sous-unité  $\alpha$ , une sous-unité  $\beta$  et une séquence peptidique « espaceur » entre les deux sous-unités (Hewitt *et al.*, 2000). Les NAHL-acylases possèdent deux acides aminés conservés en position 50 et 57, importants pour la fixation du substrat (Dong *et al.*, 2007). Chez AiiD ces résidus sont Ile et Ser (Lin *et al.*, 2003). De nombreuses NAHL-acylases sont soumises à des régulations post-traductionnelles. En effet, la plupart deviennent mûres après autoprotéolyse (Kim *et al.*, 2001). Les acylases fonctionnelles sont composées d'au moins deux sous-unités et peuvent dégrader différents types de NAHL mais présentent une meilleure affinité pour les NAHL à chaînes longues, comme cela a été démontré pour AiiD (Romero *et al.*, 2008). AiiD est également capable de dégrader des molécules comme l'ampicilline et la pénicilline G (Lin *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Les oxydoréductases

Un troisième type d'activité a été mise en évidence pour la première fois chez *Rhodococcus erythropolis* W2 ; toutefois le gène codant l'activité n'a pas encore été identifié (Uroz *et al.*, 2005). L'activité réductase convertit le groupe 3-oxo en un dérivé 3-hydroxy ou inversement. Durant la croissance de *Rhodococcus*, une modification redox des NAHL est observée pour des NAHL possédant une chaîne acyl allant de 8 à 14 carbones. L'enzyme responsable de la réduction peut également agir sur des molécules autres que les NAHL comportant un groupe 3-oxo comme le 3-oxododécaneamide qui ne possède pas de cycle lactone. La première structure obtenue d'une oxydoréductase de NAHL est celle de BpiB09 (Bijtenhoorn *et al.*, 2011), dont le déterminant provient de l'analyse d'une banque métagénomique. BpiB09 présente dans sa séquence protéique la signature spécifique des enzymes de la classe des hydrogénases/réductases des chaînes courtes et un domaine de liaison au NADP. En effet, les enzymes de la classe des oxydoréductases fonctionnent avec



des coenzymes de type NAD ou NADP. L'extension C-terminal de BpiB09 correspond, elle, au domaine de liaison au substrat et est responsable de la spécificité de l'enzyme. BpiB09 est la première enzyme de ce type décrite pour son activité NAHLase.

Les modifications au niveau des groupes substitués des NAHL n'abolissent pas obligatoirement leur fonctionnalité mais elles peuvent la perturber si le récepteur présente une très forte spécificité. Par exemple, chez *Agrobacterium tumefaciens*, la spécificité du récepteur TraR pour des NAHL présentant des substitutions 3-oxo ou 3-hydroxy est semblable (Zhu *et al.*, 1998) tandis que le récepteur LasR de *Pseudomonas* est plus spécifique des NAHL portant des substitutions 3-oxo (Passador *et al.*, 1996).

## 2.3 Les enzymes connues

### 2.3.1 Diversité des lactonases

#### 2.3.1.1 Les clusters AiiA-like et AttM-like

Les lactonases constituent la plus grande famille représentée au sein des enzymes qui ont la capacité de dégrader les NAHL. Cette activité lactonase a été décrite chez de nombreuses espèces bactériennes et également chez des organismes eucaryotes tels que les champignons et les mammifères.

Au sein des bactéries, ces enzymes sont retrouvées principalement chez les *Firmicutes* et les  *$\alpha$ -proteobacteria* mais on en retrouve également parmi les *Actinobacteria* et les autres *Proteobacteria*. Des analyses phylogénétiques sur les différentes lactonases connues mettent en évidence deux clusters distincts (Dong et Zhang, 2005). Le premier regroupe les protéines proches de la lactonase AiiA de *Bacillus subtilis* ; il est appelé le cluster AiiA-like. Ce cluster comprend des homologues à AiiA identifiés chez d'autres espèces de *Bacillus*. Les membres de ce cluster AiiA-like présentent près de 90% d'identité de séquence. Des analyses phylogénétiques récentes sur des lactonases putatives ou caractérisées proches d'AiiA de *Bacillus sp.* SB4 ont mis en évidence des régions conservées dans les séquences nucléotidiques. Ces régions conservées peuvent donc servir à amplifier les gènes codant des NAHL-lactonases de différentes bactéries. De plus, certaines régions sont retrouvées uniquement au sein d'un groupe taxonomique particulier. Dans ce cas, ces régions peuvent être utilisées afin d'amplifier les gènes de genres bactériens spécifiques (Kalia *et al.*, 2011). Le deuxième cluster, nommé AttM-like, en référence à la lactonase AttM d'*Agrobacterium*





*tumefaciens* C58, comprend la deuxième lactonase d'*Agrobacterium tumefaciens* AiiB, AhlD d'*Arthrobacter*, QsdA de *Rhodococcus* W2, et aussi QlcA identifiée sur un clone issu d'une banque métagénomique (Zhang *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2003 ; Uroz *et al.*, 2008 ; Riaz *et al.*, 2008). Les enzymes du cluster AttM-like partagent 30 à 58% d'homologie au niveau de leurs séquences peptidiques. Toutes les enzymes de ces deux clusters sont des métalloprotéines et possèdent le motif de liaison au zinc. Cependant, les membres du cluster AttM-like ne présentent pas plus de 25% d'identité avec ceux du cluster AiiA-like (Dong *et al.*, 2005).

#### 2.3.1.2 Les autres lactonases bactériennes

La protéine QsdA de *Rhodococcus erythropolis* présente le motif de liaison au zinc représentatif des métalloprotéines zinc-dépendantes. Cette protéine comme SsoPox de *Sulfolobus solfataricus* est une métalloprotéine mais elle appartient à la famille des PLLs et non pas à celle des métallo- $\beta$ -lactamases. D'autres PLLs ont été caractérisées telles que les protéines PPH chez *Mycobacterium tuberculosis* ou AhlA chez *Rhodococcus erythropolis* (Afriat *et al.*, 2006). Ces deux PLLs dégradent différentes NAHL avec une affinité plus forte pour les NAHL à chaînes longues et des substitutions 3-oxo mais ont une faible activité phosphotriestérase. Les différentes PLLs ont donc des spécificités de substrat différentes mais toutes dégradent les NAHL. Aucun substrat naturel des phosphotriestérases (PTE) n'a été identifié. Les PTE pourraient avoir émergé durant le siècle dernier, conférant aux bactéries qui expriment ces enzymes la capacité d'assimiler des composés xénobiotiques tels que les organophosphorés (Raushel *et al.*, 2000). Ces gènes codant les PTE ont été identifiés sur des plasmides de bactérie du sol ; ces gènes sont potentiellement transférables d'une bactérie à une autre.

Ces dernières années, de nouvelles enzymes à activité lactonase ne possédant pas le motif commun aux métallo- $\beta$ -lactamases et aux PLLs ont été découvertes : AidH identifiée chez *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 (Mei *et al.*, 2010), AiiM chez *Microbacterium testaceum* (Wang *et al.*, 2010), les protéines Bpi01, Bpi04 et Bpi07 d'une part et la protéine Bpi05 d'autre part provenant de clones de deux banques métagénomiques générées à partir d'ADN extrait du sol (Schipper *et al.*, 2009 ; Bijtenhoorn *et al.*, 2011). Toutes ces enzymes peuvent dégrader un large spectre de NAHL substituées ou non mais chacune possède ses propres spécificités vis-à-vis de chaque NAHL. Ces protéines ne présentent pas le même site actif que les autres lactonases et les mécanismes de réaction ne sont pas encore connus. L'analyse des séquences protéiques montrent que les protéines AidH et AiiM appartiennent à



la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases et AidH présente une activité plus forte de dégradation envers diverses NAHL en présence de  $Mn^{2+}$  (Mei *et al.*, 2010). L'an dernier, des NAHL-lactonases ont été découvertes chez la souche de *Rhizobium* sp. NGR234 (Krysciak *et al.*, 2011). Cinq *loci* impliqués dans la dégradation ou la modification des NAHL ont été découverts par le criblage pour la dégradation des NAHL d'une banque de cosmides construites à partir de l'ADN génomique de *Rhizobium* sp. NG234. Deux protéines ont été caractérisées et des analyses HPLC montrent que les protéines QsdR1 et DlhR dégradent la 3OC8HSL par ouverture du cycle lactone. L'activité est donc de type lactonase. QsdR1 pourrait appartenir à la famille des métallo- $\beta$ -lactamases tandis que DlhR est proche des dienelactone hydrolase-like comme la protéine BpiB07. Les autres *loci* *qsdr2*, *aldr* et *hitR-hydR* doivent être caractérisés. La comparaison des génomes de différentes souches de bactéries du genre *Rhizobium* ont conduit à la mise en évidence de nombreux homologues de ces 5 gènes comme chez *Rhizobium etli* CN42 ou *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Krysciak *et al.*, 2011).

### 2.3.1.3 Les lactonases eucaryotes

#### 2.3.1.3.1 Les lactonases fongiques

L'activité lactonase n'a pas uniquement été identifiée chez les organismes procaryotes. En effet, de récentes études ont montré que des champignons et des plantes sont capables de dégrader les signaux QS *via* une activité lactonase. Dans le sol, les plantes interagissent avec les bactéries mais également avec les champignons. La colocalisation des champignons et des bactéries au niveau des racines permet des échanges entre les différents organismes présents. Ainsi une étude a été menée sur la capacité de champignons du sol à interférer dans la régulation QS bactérienne (Uroz *et al.*, 2008). Le criblage pour la dégradation des NAHL à partir de surnageants de culture de plusieurs souches fongiques a conduit à l'identification de trois champignons capables de dégrader les signaux QS. Ces champignons appartiennent aux embranchements des Basidiomycètes et des Ascomycètes. L'activité enzymatique liée à la dégradation de NAHL est de type lactonase pour deux des trois isolats fongiques. Dans le sol, certaines bactéries comme *Pseudomonas aureofaciens* possèdent des capacités anti-fongiques dont l'activité est régulée par QS (Wood *et al.*, 1996). Il est donc tentant de proposer que la dégradation de signaux QS pourrait être une stratégie fongique pour lutter contre certaines bactéries qui produisent des molécules nocives pour les champignons ou pour contrôler la virulence des bactéries sur un hôte commun. En accord avec ce qui précède, certains



champignons peuvent produire des molécules qui perturbent la signalisation QS. La patuline, produite par *Penicillium* sp. a été décrite pour sa capacité à perturber la signalisation QS chez *Pseudomonas aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2005).

#### 2.3.1.3.2 Diversité des paraoxonases

Les paraoxonases ont été identifiées pour la première fois à la surface de cellules de l'épithélium pulmonaire humain (Chun *et al.*, 2004). Cette famille se divise en trois groupes, PON1, PON2 et PON3 qui présentent des homologies au niveau des séquences peptidiques d'environ 70% (Draganov *et al.*, 2005). De nombreux homologues sont retrouvés dans d'autres organismes mammifères tels que la souris, le lapin et il apparaît que les gènes qui les déterminent sont très conservés. En effet, les séquences peptidiques possèdent de 79 à 95% d'homologie. PON2 diffère des deux autres enzymes de part l'absence d'activité de dégradation du paraoxon. L'efficacité de PON1 et PON3 envers les NAHL est mille fois plus faible que celle envers d'autres lactones. L'affinité pour d'autres molécules telles que les composés organophosphorés est plus forte que celle pour les NAHL. Contrairement à PON1 et PON3, PON2 présente une spécificité envers les NAHL plus forte que pour les autres lactones. Les PONs n'auraient pas comme premier substrat les NAHL mais des dérivés lactones (Draganov *et al.*, 2005).

#### 2.3.1.3.3 Activité lactonase chez les plantes

La première activité NAHLase chez les plantes a été découverte par l'observation de la disparition de différentes NAHL dans le milieu de culture de plantules de *Lotus corniculatus* (Delalande *et al.*, 2005). L'activité lactonase a été identifiée dans des extraits de diverses plantes de la famille des légumineuses cependant le déterminant génétique n'est pas encore connu (Thèse Emile Chapelle). Ce phénomène n'est pas observé chez des plantes comme le maïs ou le blé appartenant à d'autres familles.

#### 2.3.2 Diversité des acylases

La première activité NAHL-acylase a été identifiée chez *Variovorax paradoxus* mais la protéine responsable de cette activité reste encore à identifier (Leadbetter et Greenberg, 2000). Il en est de même pour l'activité acylase déterminée chez *Rhodococcus erythropolis* (Uroz *et al.*, 2005). Néanmoins, des NAHL-acylases ont été caractérisées chez différents organismes et principalement chez des protéobactéries. Les NAHL-acylases connues



présentent une faible similarité de séquence comprise entre 20 et 35% et des spécificités de substrat différents.

Au sein des  $\beta$ -*proteobacteria*, l'acylase AiiD de *Ralstonia* a été identifiée (Lin *et al.*, 2003) et une activité acylase à large spectre chez *Comomonas* sp. D1 a été décrite (Uroz *et al.*, 2003). Chez les  $\gamma$ -*proteobacteria*, les NAHL-acylases PvdQ et QuiP de *Pseudomonas aeruginosa* ont été caractérisées (Huang *et al.*, 2003 et 2006). Les bactéries du genre *Shewanella* retrouvées dans les intestins des poissons du genre *Plecoglossus* présentent une activité NAHLase (Morohoshi *et al.*, 2008). L'étude du génome de ces bactéries a conduit à l'identification de gènes homologues à *aac* codant l'aculacéine A acylase. La séquence peptidique d'Aac déduite de la séquence nucléotidique de la souche *Shewanella* MIB015 présente près de 27% d'identité avec l'acylase AiiD de *Ralstonia*. Le clonage de cet homologue *acc* a permis de confirmer l'activité acylase. Aac comme PvdQ et QuiP présentent une activité acylase sur les NAHL à chaînes longues telle que la C10HSL (Huang *et al.*, 2003 ; Morohoshi *et al.*, 2008).

La cyanobactérie *Anabaena* sp. PCC 7120 produit des NAHL durant sa phase de croissance exponentielle mais une disparition des signaux est observée au-delà de cette phase. L'étude du génome d'*Anabaena* sp. a permis de découvrir des gènes présentant des homologies avec les acylase QuiP et PvdQ (Kaneko *et al.*, 2001). Le gène *all3924* d'*Anabaena* sp. PCC 7120 code l'acylase AiiC qui partage 29% d'identité et 47% de similarité avec QuiP de *Pseudomonas* (Romero *et al.*, 2008).

Chez les *Actinobacteria*, l'acylase AhlM de *Streptomyces* a été caractérisée pour sa capacité à dégrader les NAHL (Park *et al.*, 2005). AhlM semble présenter une affinité plus forte envers les NAHL composées d'une chaîne acyl de plus de six carbones et non substituée. De même que AiiD, AhlM peut catalyser l'hydrolyse de la pénicilline G. AhlM est de plus la première enzyme à activité NAHLase extracellulaire décrite.

### 2.3.3 Diversité des Oxydoréductases

A ce jour, trois oxydoréductases ont été décrites pour leur capacité à moduler les fonctions régulées par QS, dont une réductase identifiée chez *Rhodococcus erythropolis* W2, mais non caractérisée (Uroz *et al.*, 2005). La protéine BpiB09 dont la structure a été résolue code une réductase dépendante du NADP (Bijtenhoorn *et al.*, 2011). Cependant l'affiliation précise de cette protéine à une famille ou un genre bactérien est délicate car le gène codant





BpiB09 est porté par un clone d'une banque métagénomique construite à partir d'ADN extrait du sol. Des analyses phylogénétiques suggèrent que BpiB09 est proche de protéines provenant de bactéries des genres *Acidobacterium* et *Koribacter*. La deuxième enzyme caractérisée a été identifiée chez *Bacillus megaterium*. Chez cette bactérie, la monooxygénase CYP102A1 de la famille des cytochromes P450 montre une activité NAHLase par oxydation de la chaîne acyl (Chowdhary *et al.*, 2007). Cette enzyme dégrade des acides gras, des acyl homosérines et des NAHL et la modification du groupe 3-oxo entraîne une baisse d'activité des NAHL d'un facteur 20.

La découverte de l'activité NAHLase au sein de cette classe des oxydoréductases sous-entend l'existence d'autres protéines de ce type possédant potentiellement une activité NAHLase ce qui étend les possibilités de stratégies de QQ.

#### 2.4 *Quorum quenching* dans les interactions procaryotes/eucaryotes

Le contrôle des pathogènes est un enjeu important tant au niveau des pathogènes des animaux que ceux touchant les cultures à destination du secteur agroalimentaire. La découverte des enzymes de dégradation des NAHL chez les bactéries et les eucaryotes ont ouvert de nouvelles pistes pour développer des stratégies de lutte visant la régulation QS. Le rôle de cette dégradation dans les fonctions régulées par QS a été étudié chez certaines bactéries pathogènes. Quelques exemples sont présentés dans cette partie.

##### 2.4.1 *Quorum quenching* dans les infections par *Pseudomonas aeruginosa*

###### 2.4.1.1 La virulence et les PONs

Chez *P. aeruginosa*, la régulation QS favorise la formation de biofilms et régule la production de nombreux facteurs de virulence (Smith *et al.*, 2003). La capacité des paraoxonases, découvertes chez les animaux, à dégrader les NAHL telles que la 3OC12HSL produit par *P. aeruginosa* lors d'une infection a conduit à étudier ce phénomène de plus près afin de rechercher des applications potentielles à cette propriété, en termes de traitements antibactériens. Il a été montré que du sérum de souris, dans lequel est fortement exprimé PON1, dégrade la 3OC12HSL et diminue la croissance des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et que cette capacité est absente lorsque que la culture de *Pseudomonas* est supplémentée par un sérum d'une souris PON1 knock-out (Ozer *et al.*, 2005). Chez les arthropodes, l'existence de paraoxonase n'a pas été démontrée. Or, l'expression hétérologue de PON1 dans *Drosophila melanogaster* permet d'augmenter la survie de ces mouches



lorsqu'elles sont infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (Estin *et al.*, 2010). De même, des lysats de cultures de cellules épithéliales de souris dans lesquelles la protéine PON2 a été mutée présentent une plus faible capacité à dégrader la 3OC12HSL (Stolz *et al.*, 2008). Cela indique l'importance des paraoxonases dans le contrôle de la régulation QS de *Pseudomonas aeruginosa*. De récentes études ont montré que la 3OC12HSL régule négativement l'expression de PON2 dans des cultures de cellules épithéliales (Horke *et al.*, 2010).

Chez *P. aeruginosa* PAO1, une acylase proche de PvdQ responsable de la dégradation des NAHL a été identifiée. L'ajout de cette protéine PA2385 purifiée dans une culture de *Pseudomonas* inhibe l'accumulation des NAHL dans le milieu de culture et diminue la production des enzymes extracellulaires régulées par QS telles que les élastases (Sio *et al.*, 2006). De même, l'expression hétérologue de la réductase BpiB09 atténue la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1 (Bijtenhoorn *et al.*, 2011). La dégradation des signaux QS peut donc se faire *via* des enzymes bactériennes ou eucaryotes. Cela étend les possibilités de QQ pour lutter contre ce type d'infection qui est problématique dans le domaine hospitalier.

#### 2.4.1.2 Compétition, virulence et *quorum quenching*

Comme on l'a vu plus haut, chez *P. aeruginosa*, les élastases ou les sidérophores constituent des biens communs mis à la disposition de tous les individus environnants. Il a été montré que les populations de *Pseudomonas* peuvent être envahies par des tricheurs qui ne produisent pas ces exoproduits mais qui en profitent comme lors d'infection de patients humains par *Pseudomonas*, où la présence de tricheurs présentant des mutations dans le système QS a été observée (Diggle *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2006). D'un point de vue médical, cela permet de maintenir une virulence modérée car une seule partie de la population produit les signaux pour toutes les bactéries ; les fonctions sont donc activées plus tardivement et l'expression des gènes régulés par QS n'est pas maximale.

Cependant, le problème d'apparition de résistances aux antibiotiques a conduit à l'utilisation d'autres méthodes pour lutter contre les infections par *Pseudomonas aeruginosa* comme les stratégies basées sur l'inhibition de QS. L'azithromycine est un antibiotique peu efficace sur *Pseudomonas* mais il apparaît que cette molécule perturbe l'expression des gènes de virulence régulés par QS (Tateda *et al.*, 2001). Le traitement par l'azithromycine de patients infectés par *Pseudomonas aeruginosa* induit une baisse des exoproduits mis à disposition des tricheurs et donc la perte de leur avantage à ne pas produire les exoproduits. Cela se traduit par une baisse de fitness des tricheurs non-coopératifs mutés dans la



signalisation QS (mutants *lasR*) et une augmentation en fréquence des populations virulentes (Köhler *et al.*, 2010).

La lutte contre les infections par *Pseudomonas aeruginosa* basées sur des stratégies anti-QS peut donc sélectionner des souches plus virulentes. De même, l'effet de la dégradation des signaux QS sur les populations de tricheurs (moins virulents) n'a pas été étudié. L'impact de la perturbation du QS sur l'écologie et l'évolution de la virulence des bactéries pathogènes devrait être étudié et pris en compte dans l'élaboration de stratégies contre *Pseudomonas aeruginosa* et autres pathogènes dont la virulence est régulée par QS.

#### 2.4.2 Rôles des lactonases chez *Agrobacterium tumefaciens* C58

Les lactonases AttM et AiiB identifiées chez *Agrobacterium tumefaciens* C58 sont associées à la famille des métallo- $\beta$ -lactamases et appartiennent au cluster AttM-like. Ces deux lactonases présentent un impact sur l'accumulation des signaux QS chez *Agrobacterium tumefaciens* et leur implication dans les fonctions régulées par QS a été étudiée (Haudecoeur *et al.*, 2009a).

##### 2.4.2.1 Implication d'AttM

Des expériences de conjugaison en microplaques et *in planta* montrent qu'un mutant *attM* transfère plus précocement que la souche sauvage son pTi à une bactérie réceptrice. L'impact d'AttM sur la conjugaison est décrit comme faible et transitoire (Khan *et al.*, 2009). De même, l'agressivité d'un mutant *attM* sur tomate et tabac est légèrement plus forte que la souche sauvage (Haudecoeur *et al.*, 2009a). Par ailleurs, des études ont montré que la proline, en abondance dans les tumeurs matures, exerce un effet antagoniste de l'effet inducteur du GABA par compétition pour le récepteur (Haudecoeur *et al.*, 2009b). La proline serait donc un des facteurs expliquant la faible implication d'AttM dans les fonctions régulées par QS.

##### 2.4.2.2 Implication d'AiiB

Un mutant *aiiB* accumule plus d'OC8HSL dans le milieu de culture que la souche sauvage. Des essais sur tabac et tomate montrent que le mutant *aiiB* est plus agressif que la souche sauvage et que le mutant *attM* (Haudecoeur *et al.*, 2009a). De plus, le transfert du pTi du mutant augmente de manière transitoire. Dans le mutant *aiiB*, il n'y a pas de dégradation des signaux QS, le transfert de pTi peut se faire plus précocement car la concentration en molécules signal nécessaire à l'activation des fonctions régulées par QS est atteinte plus tôt.



Les lactonases présentent un effet sur les fonctions régulées par QS en empêchant l'activation des fonctions régulées par QS dans les stades précoces de l'interaction. En début d'interaction, le GABA et les agrocinopines produits par les plantes induisent l'expression de ces lactonases. Pendant la croissance de la tumeur, le nombre de cellules transformées augmente, la production d'agrocinopines également ce qui va induire fortement l'expression de TraR qui en se complexant aux NAHL les protègent de la dégradation ; le complexe active également la boucle d'autoinduction de la synthèse des NAHL. Par ailleurs, la proline qui s'accumule au cours du développement de la tumeur inhiberait l'induction d'AttM par le GABA et donc la dégradation des NAHL. La signalisation QS chez *A. tumefaciens* C58 fait intervenir un système complexe de régulation qui implique un dialogue moléculaire constant entre la plante et la bactérie.

#### 2.4.3 *Quorum quenching* et phytoprotection

Plusieurs stratégies de QQ ont été développées afin de moduler le pool de NAHL disponible et donc d'inhiber la signalisation QS chez des pathogènes de plantes. On distingue deux types de stratégie. Le premier concerne l'expression hétérologue d'un gène conférant la dégradation des NAHL dans la plante-hôte. Le second consiste en l'utilisation de bactéries dégradatrices des NAHL comme agents phytoprotecteurs.

##### 2.4.3.1 Plantes transgéniques

Le gène *aiiA* de *Bacillus subtilis* codant une NAHL-lactonase a été inséré dans le génome du tabac et de la pomme de terre (Dong *et al.*, 2001). Des extraits protéiques de feuilles de tabacs et de tubercules de pomme de terre exprimant la lactonase AiiA dégradent la 3OC6HSL *in vitro*. Des expériences d'infection de ces plantes transgéniques par le pathogène *Pectobacterium* montrent que les symptômes sur plantes transgéniques sont moins marqués. La dégradation des signaux QS induit une expression plus faible des facteurs de virulence. Une seconde expérience dans laquelle le pathogène est inoculé à une plus forte densité conduit au même résultat. L'expression de la lactonase AiiA dans les plantes leur confère donc une résistance accrue aux pathogènes. Cette étude démontre l'intérêt d'une application agronomique d'une telle stratégie ; cependant, le contexte social actuel en matière d'organismes génétiquement modifiés en Europe ne permet pas le développement de telles méthodes de lutte contre les pathogènes (Uroz *et al.*, 2003 ; Dong *et al.*, 2004).





#### 2.4.3.2 Bactéries ou communautés dégradatrices

Le deuxième type de stratégie QQ implique l'utilisation de bactéries qui dégradent les signaux QS. Le terme d'agents de lutte biologique est employé pour désigner ces bactéries dégradatrices des NAHL utilisées afin de protéger une plante-hôte contre son pathogène. La bactérie peut naturellement être dégradatrice des NAHL ou être artificiellement modifiée pour acquérir cette capacité. Le criblage fonctionnel de bactéries cultivables est également un moyen de découvrir de nouveaux agents de lutte biologique naturels.

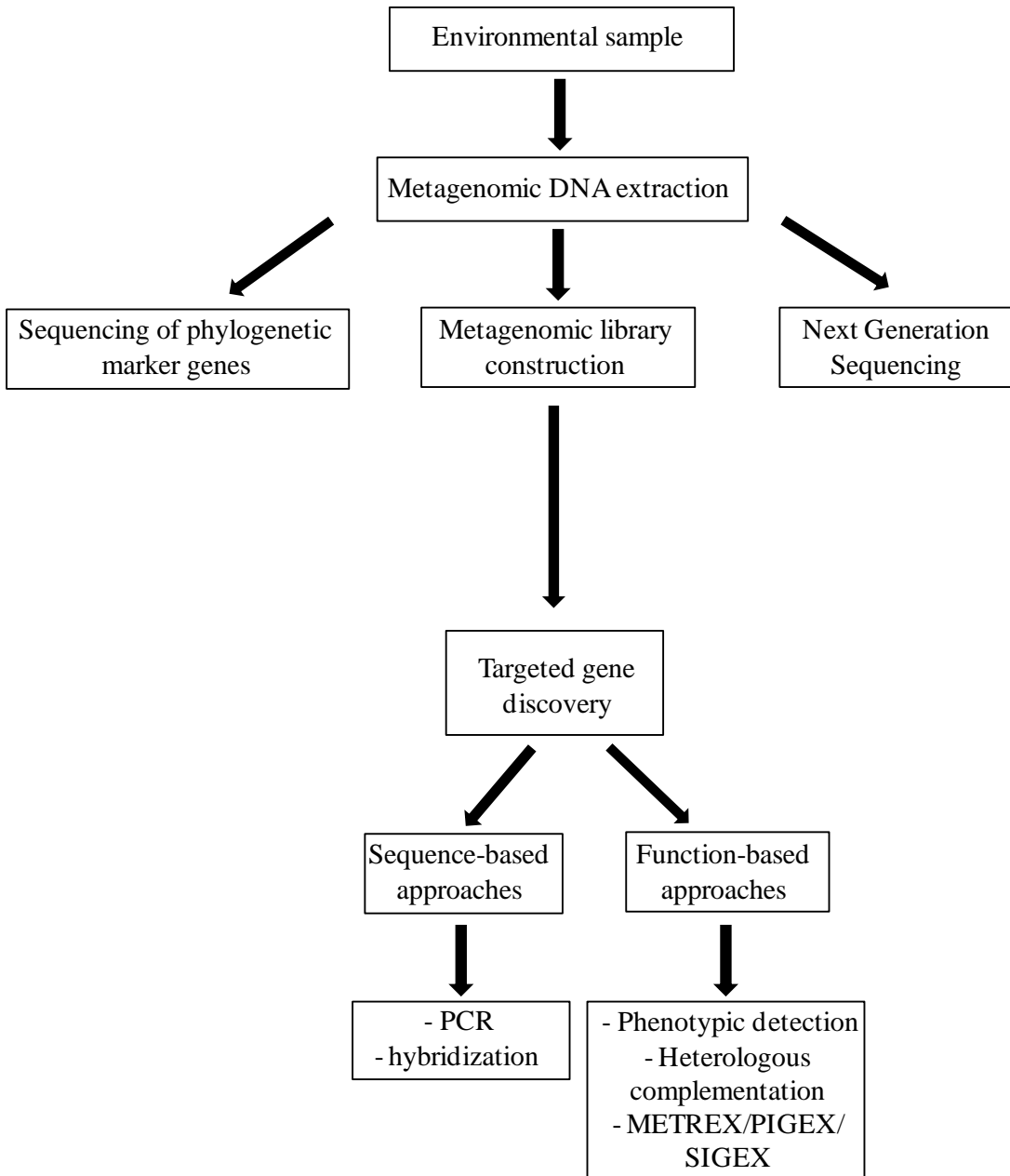
Le plasmide pME6863 sur lequel a été cloné le gène *aiiA* de *Bacillus* a été introduit dans une souche de *Pseudomonas fluorescens* qui ne dégrade pas les NAHL (Molina *et al.*, 2003). L'apport d'*aiiA* dans cette souche lui confère la capacité de dégrader les NAHL et de perturber l'expression de phénotypes régulés par QS comme la virulence de *Pectobacterium* sp. ou le transfert conjugatif du pTi chez *Agrobacterium tumefaciens*.

Une autre approche, développée au laboratoire consiste à stimuler la croissance de bactéries dégradant les NAHL au sein de consortia issus du sol (Cirou *et al.*, 2007). En présence de  $\gamma$ -caprolactone (GCL), une molécule naturelle et biodégradable structurellement proche des NAHL, les populations dégradatrices des signaux NAHL augmentent en proportion dans les populations bactériennes. L'inoculation de *consortia* sur tubercules de pomme de terre après culture en présence de GCL diminue les symptômes dus à *Pectobacterium* sp.. La plupart des bactéries stimulées par la GCL identifiées appartiennent au genre *Rhodococcus*. La souche *Rhodococcus erythropolis* R138, isolée à partir d'une rhizosphère de pomme de terre, croît sur GCL, dégrade rapidement les NAHL et bloque l'émergence des symptômes sur tubercule de pomme de terre (Cirou *et al.*, 2011). Cette souche constitue donc un agent de lutte biologique intéressant. Le couplage de la souche R138 et de la GCL permet de maintenir dans la rhizosphère une forte population de bactéries dégradatrices des NAHL et ainsi d'optimiser la protection des plantes.

### 2.5 *Quorum quenching* et métagénomique

#### 2.5.1 Principe de la métagénomique

La plupart des études sur le QS et QQ jusqu'en 2005 reposaient sur l'étude de bactéries cultivables qui ne représentent en général qu'une très faible proportion de la diversité totale d'un environnement. La métagénomique constitue un outil qui permet de s'affranchir de la culture en laboratoire et d'accéder à une diversité spécifique et fonctionnelle



**Figure 12** : Analyse métagénomique de communautés microbiennes environnementales. Adapté de Simon et Daniel, 2011

encore ignorées. Les études métagénomiques débutent toutes par l'isolation du matériel génomique d'organismes cellulaires présents dans un échantillon d'un environnement particulier (Figure 12). A partir d'ADN microbien extrait d'un environnement, trois choix sont possibles : le séquençage de marqueurs phylogénétiques tels que les gènes 16S ARNr, RecA, EF-Tu, RNA polymérase B (RpoB) et le séquençage aléatoire d'ADN métagénomique qui permettent d'accéder à la diversité taxonomique mais aussi fonctionnelle et la construction d'une banque métagénomique pour la découverte de gènes ou composés cibles. L'analyse d'une banque métagénomique implique les étapes principales suivantes : i) isolement de l'ADN, ii) fragmentation et insertion de l'ADN dans un vecteur approprié, iii) clonage et transformation dans un hôte de choix, iv) construction de la banque métagénomique, v) criblage de la banque.

La construction d'une banque métagénomique requiert une quantité d'ADN suffisante et représentative de la communauté bactérienne du milieu. Des biais peuvent avoir lieu selon les méthodes d'extraction de l'ADN et des substances contaminantes peuvent perturber l'activité des enzymes de digestion et l'amplification PCR ou diminuer l'efficacité de clonage et de transformation des cellules lors de la construction de la banque métagénomique. L'extraction de l'ADN est ainsi considérée comme l'étape cruciale (Daniel, 2005). Des protocoles d'extraction d'ADN provenant d'environnements divers (sols, océans, animaux) sont pour cela développés. La taille des fragments varie selon les vecteurs utilisés. Les plasmides portent des inserts de moins de 15kb tandis que les cosmides et les fosmides peuvent porter des inserts allant jusqu'à 40kb. Au-delà de 40kb, les inserts sont clonés dans des BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*). Les banques analysées à ce jour étaient constituées de 3000 à 10 000 000 de clones métagénomiques (Mocali *et al.*, 2010). La taille des banques dépend donc de la taille des inserts et du nombre de clones et l'équivalent en Mb est généralement estimé.

L'exploitation de banques métagénomiques peut se faire par une approche basée sur les séquences ou sur l'aspect fonctionnel. Dans le premier cas, cela implique de créer et d'utiliser des sondes PCR, ou des sondes d'hybridation pour trouver des gènes cibles. L'utilisation d'amorces dégénérées basées sur les régions conservées et l'hybridation ne permettent cependant que la découverte de gène codant pour une famille de protéines déjà connues. Dans le deuxième cas, le criblage fonctionnel se fait la plupart du temps par la détection phénotypique qui emploie des colorants chimiques ou des substrats d'enzymes liés à des chromophores qui peuvent être détectés visuellement ou par spectrophotométrie. D'autres systèmes de criblages intracellulaires nommés PIGEX pour « *product-induced gene*



expression », et SIGEX pour « substrate-induced gene expression » ont également été développés pour améliorer la détection de nouveaux composés d'intérêt (Uchiyama *et al.*, 2010 ; Williamson *et al.*, 2005). Une autre catégorie de criblage fonctionnel est basée sur la complémentation hétérologue de souches hôtes ou de mutants de souches hôtes qui nécessitent la présence de gènes cibles pour croître dans des conditions sélectives.

Cette approche fonctionnelle rend la découverte de gènes et de composés encore inconnus possible. L'utilisation de la métagénomique pour l'étude de fonctions QS semble donc pertinente pour étudier la communication cellulaire à l'échelle des populations.

### 2.5.2 Recherche de nouvelles enzymes de dégradation des NAHL

Plusieurs banques métagénomiques dont l'ADN a été extrait de sols ont été criblées pour la capacité de dégradation des NAHL et ont permis d'étendre la diversité des enzymes de dégradation des NAHL. L'utilisation de bioindicateurs tels que *Chromobacterium* ou *Agrobacterium* permet de mesurer l'induction des fonctions régulées par QS. La dégradation des NAHL s'observe par l'absence de phénotype du bioindicateur. Ainsi, dans une banque métagénomique de 10 121 fosmides, une nouvelle enzyme de dégradation des NAHL a été identifiée (Riaz *et al.*, 2008). La protéine code une lactonase nommée QlcA. L'analyse d'une seconde banque de 7392 clones a révélé la capacité de trois clones métagénomiques à dégrader la 3OC8HSL (Schipper *et al.*, 2009). Deux des clones présentent une activité lactonase. Plus récemment, le criblage d'une banque métagénomique a permis d'identifier une nouvelle enzyme de dégradation des NAHL présentant une activité réductase (Bijtenhoorn *et al.*, 2011). La métagénomique a donc permis la mise en évidence de plusieurs enzymes à activité NAHLase dont certaines ne présentent pas de similarités avec les NAHLases connues.

### 2.5.3 Découverte de molécules antagonistes ou agonistes

Il a été montré que certaines NAHL peuvent être des antagonistes pour certaines espèces bactériennes ; ainsi la C4HSL de *Pseudomonas* inhibe le récepteur LuxR qui reconnaît la C8HSL (Zhu *et al.*, 1998). De même, une modification dans la structure des NAHL par exemple au niveau du cycle lactone peut avoir un effet inhibiteur important (Morohoshi *et al.*, 2008). Une méthode de criblage intracellulaire appelée METREX pour « metabolite regulated expression » a notamment été mise au point afin d'identifier des clones métagénomiques qui induisent ou qui inhibent le QS (Williamson *et al.*, 2005). Cette



technique consiste en l'utilisation d'une souche bioindicatrice, ne produisant aucune NAHL, dans laquelle un plasmide porte le gène *luxR* de *Vibrio fischeri* ainsi que la région promotrice de *luxI* fusionnée au gène codant pour la GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Andersen *et al.*, 2001). Le vecteur portant l'ADN métagénomique est inséré également dans la souche bioindicatrice. En présence de composés inducteurs de *luxI*, donc de la fusion, l'émission de fluorescence est observée par microscopie. Un premier criblage d'environ 50 000 clones dont l'ADN provient de différents sols de l'Alaska a permis d'identifier plusieurs clones qui induisent la fluorescence et deux qui l'inhibent (Andersen *et al.*, 2001). Le criblage par la même technique d'une banque métagénomique de 800 000 clones obtenue à partir de l'ADN de microbes présents dans les intestins d'insectes a révélé un clone produisant un inducteur du QS. Il a été montré que la molécule active nommée QSM-1 est un dérivé de l'indoxyle produit après hydrolyse et oxydation de dérivés indoliques (Guan *et al.*, 2007). QSM-1 représente donc une nouvelle classe de composés qui induisent le promoteur QS.

Plusieurs gènes de synthèse des NAHL ont également été découverts par de telles techniques (Williamson *et al.*, 2005). Parmi les gènes identifiés, certains ne présentent que peu d'homologie de séquences avec ceux déjà connus. De plus, certains codent la synthèse de NAHL insaturées ou présentant des longues chaînes substituées non décrites auparavant (Hao *et al.*, 2010). Le criblage de banques métagénomiques est donc un outil puissant pour identifier de nouveaux gènes et nouvelles molécules notamment dans le cas de la signalisation QS. Les nombreux exemples cités ci-dessus suggèrent que les organismes impliqués dans la signalisation QS faisant intervenir les NAHL sont largement sous-estimés lorsque l'on étudie cette diversité par une approche basée sur la culture en laboratoire des bactéries (D'Angelo-Picard *et al.*, 2005).





## 2.6 Conclusions générales

La découverte récente de la capacité de certains organismes à dégrader les NAHL a élargi les possibilités de lutte contre les pathogènes dont la virulence est régulée par QS. Concernant les autres molécules signal, il a été montré que la NADPH-oxydase *via* la formation de composés oxydants inactive les signaux QS de type AI-2 (M Dowell *et al.*, 2001). Les NADPH-oxydase sont des enzymes présentes notamment dans les phagocytes et les lymphocytes des cellules animales. Dans ce cas, la communication QS bactérienne est perturbée par des eucaryotes. La signalisation QS est un mécanisme très complexe dans lequel les eucaryotes peuvent intervenir ; le contrôle par les bactéries ou par des eucaryotes de cette signalisation montre l'importance d'une telle régulation et notamment dans les interactions bactéries/eucaryotes.



## Objectifs du travail expérimental

Le rôle de la dégradation enzymatique des signaux de communication *quorum sensing* sur les fonctions régulées par QS a été étudié selon deux approches expérimentales dans ce travail doctoral.

Dans le chapitre II, j'ai étudié l'impact d'une stratégie de *quorum quenching* visant à stimuler les populations bactériennes dégradant les NAHL à des fins de protection des plants de pomme de terre contre le phytopathogène *Pectobacterium carotovorum*. Pour cela, l'efficacité du traitement  $\gamma$ -caprolactone (GCL) à stimuler les populations bactériennes dégradant les NAHL, et son impact sur les populations bactériennes totales présentes dans la rhizosphère de plants de pomme de terre ont été évalués. Une approche de métagénomique fonctionnelle a été employée pour la recherche de gènes impliqués dans la dégradation des NAHL dans le double objectif d'identification de gènes marqueurs du traitement GCL dans les expériences réalisées, et d'accroissement de nos connaissances sur la biodiversité génétique et fonctionnelle associée à la dégradation des NAHL.

Dans le chapitre III, je me suis intéressée au rôle de la dégradation des signaux QS dans la modulation du transfert du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 et notamment celui de « tricheurs » ne produisant pas de signaux NAHL mais utilisant ceux produits par les autres bactéries afin de transmettre leur propre plasmide Ti. Ce projet a nécessité la mise en place d'un système d'étude permettant la mesure du transfert de pTi de ces tricheurs bactériens. La disponibilité des signaux NAHL extracellulaires et le niveau de transfert du pTi de tricheurs ont été ensuite évalués dans différentes conditions de production et de dégradation des signaux NAHL *in vitro* et *in planta*, en utilisant des plantes transgéniques capables de dégrader les signaux NAHL. Ce travail a permis de tester l'hypothèse selon laquelle *A. tumefaciens* utiliserait les enzymes de dégradations des NAHL de type lactonase (AttM et AiiB) afin de limiter la dissémination de plasmides tricheurs.



## Chapitre II - Evaluation d'une stratégie de quorum quenching par des approches de métagénomique

Chez *Pectobacterium*, pathogène de la pomme de terre, l'expression des facteurs de virulence est régulée par *quorum sensing*. Une stratégie de *quorum quenching* développée au laboratoire consiste à stimuler dans la rhizosphère la croissance des populations bactériennes capables de dégrader les signaux NAHL par l'application d'une molécule biodégradable, la  $\gamma$ -caprolactone (GCL) (Cirou *et al.*, 2007 ; Cirou *et al.*, 2011). Des essais de biostimulation ont été réalisés en bacs de culture hydroponique dans la station du Comité Nord Producteur de Plants de Pomme de Terre à Bretteville-du-grand-Caux (Basse-Normandie).

Les objectifs du travail présenté dans cette partie du manuscrit sont i) d'évaluer l'efficacité du traitement GCL à stimuler les populations dégradant les NAHL, ainsi que l'impact de cette stratégie sur les populations bactériennes totales présentes dans la rhizosphère de pomme de terre ii) trouver par une approche de métagénomique fonctionnelle des gènes codant la dégradation des NAHL, ces gènes pouvant d'une part servir de marqueurs du traitement GCL dans les expériences réalisées, d'autre part, contribuer à notre connaissance de la biodiversité associée à la dégradation des NAHL.

L'originalité de ce travail réside dans l'approche métagénomique utilisée pour rechercher des gènes codant la dégradation des NAHL. Pour cela, une banque métagénomique a été construite à partir d'ADN extrait des bacs de cultures hydroponiques de plants de pomme de terre traités par la GCL. La construction de la banque métagénomique a été réalisée par la société LIBRAGEN. Le criblage de la banque a été effectué dans notre laboratoire lors de mon doctorat, avec l'aide d'Amélie Cirou et Aurélie Raffoux (CNRS, Gif-sur-Yvette). J'ai également réalisé les étapes d'identification et de caractérisation du gène *qsdB* codant la dégradation des NAHL. Les analyses HPLC/MS révélant la disparition des NAHL ont été menées au laboratoire ICSN en collaboration avec Odile Thoison.

Amélie Cirou a réalisé les expériences de numération sur les bactéries cultivables ainsi que les analyses HPLC/MS sur le devenir de la GCL en collaboration avec l'ICSN à Gif-sur-Yvette. L'étude de la diversité des populations bactériennes par analyses DGGE a été soustraite à *Microbial Insights* (Rockford, TN, USA). Samuel Mondy (CNRS, Gif-sur-Yvette) a analysé les données de séquençage 454 et des puces taxonomiques. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article soumis à *Environmental Microbiology* (Tannières *et al.*).



Functional metagenomics reveals a quorum-quenching enzyme QsdB that belongs to the amidase signature (AS) family.

Mélanie Tannières<sup>1</sup>, Amélie Beury-Cirou<sup>1,2</sup>, Samuel Mondy<sup>1</sup>, Aurélie Raffoux<sup>1</sup>, Odile Thoison<sup>3</sup>, Yves Dessaux<sup>1</sup>, and Denis Faure<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Comité Nord Plants de Pommes de Terre, CNPPT, Semences, Innovation, Protection, Recherche et Environnement, SIPRE, 62217 Beaurains, France

<sup>3</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France

\* For correspondence :

Centre National de la Recherche Scientifique

Institut des Sciences du Végétal - UPR2355

1, Avenue de la Terrasse

91 198 Gif-sur-Yvette, France

Phone: (33) 1 69 82 35 77

Fax: (33) 1 69 82 36 95

e-mail: faure@isv.cnrs-gif.fr





## 1 Summary

Quorum-quenching (QQ) enzymes are involved in the degradation of quorum-sensing (QS) signals such as N-acylhomoserine lactones (NAHL). In this work, potato rhizospheres were amended with gamma-caprolactone (GCL) to stimulate the NAHL-degrading bacterial community. Comparison of *rrs*-diversity by pyrosequencing confirmed a drastic effect of GCL treatments on rhizospheric communities. A metagenomic library of 29 760 fosmids was constructed with DNA from GCL-treated bacterial community, and screened for QQ-activity. A single fosmid, p90H6 that contains a 39 632-bp insert was identified. Gene *qsdB*, subcloned from p90H6, conferred NAHL-degradation upon *E. coli*, and decreased QS-regulated virulence upon its expression in *Pectobacterium*. A *qsdB* ortholog was identified in *Burkholderia cenocepacia* and also coded for NAHL-degradation. QsdB belonged to the amidase signature (AS) family and is phylogenetically related to NylA, OctHD, and LibA which are involved in degradation of nylon and linuron. QsdB is the first AS-family member exhibiting NAHLase activity. Quantification of QQ-genes *attM*, *qsdA* and *qsdB* by qPCR in the GCL treated rhizospheres showed a high abundance of *qsdB*, suggesting that the encoded protein could significantly contribute to QS signal degradation in plant-associated bacterial communities. This metagenomic study extends the diversity of QQ-enzymes and highlights a common phylogenic origin of AS-family enzymes involved in the degradation of natural compounds (NAHL) and xenobiotics (nylon and linuron).

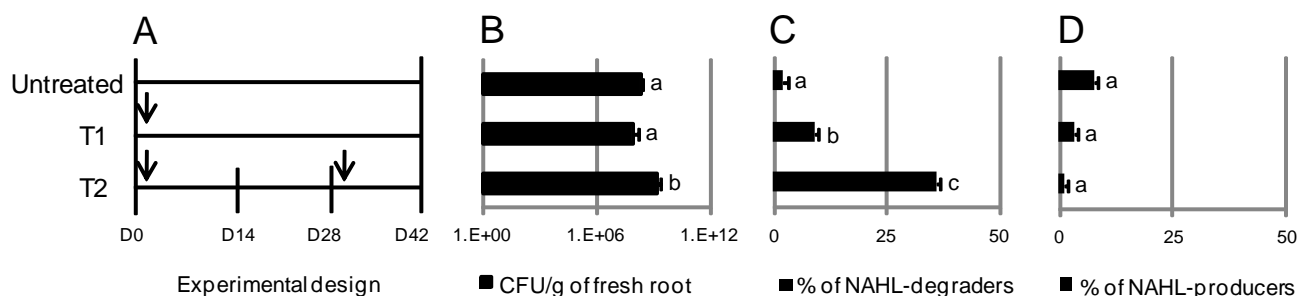
Additional key-words: quorum-sensing, biostimulation, pyrosequencing, potato plant, rhizosphere, NylA



## 2 Introduction

N-acylhomoserine lactones (NAHL) are diffusible signals used by many *Proteobacteria* to correlate gene expression to cell density via a regulatory pathway called quorum-sensing (QS) (Fuqua *et al.*, 1994; Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009). Beside the enzymes implicated in biosynthesis of NAHL, others are able to cleave NAHL, hence to disrupt QS-signaling (reviewed by Uroz *et al.*, 2009). They have been identified in bacteria and eukaryotes, and are collectively called NAHLases or quorum-quenching (QQ) enzymes (Zhang *et al.*, 2003). The biological role of NAHLases generally remains unclear, except in some firmicutes where they may contribute to the degradation of toxic NAHL derivatives (Kaufmann *et al.*, 2005), or in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*, where they contribute to the fine tuning of QS regulated functions (Haudecoeur *et al.*, 2009a and 2009b). In spite of this lack of information on the biological roles of NAHLases, these enzymes have been used successfully to quench QS-regulated functions. For instance, virulence in the plant pathogen *Pectobacterium* could be reduced or abolished either via the production of transgenic plants expressing an NAHLase-encoding gene (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001), or by the selection of bacterial isolates or populations exhibiting NAHLase activities (Uroz *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004; Cirou *et al.*, 2007).

Functional metagenomics, which includes screening of environmental-DNA libraries for enzymatic activities or metabolite synthesis, emerged as a powerful approach for exploring and exploiting the natural biodiversity of microorganisms (see reviews by Kennedy *et al.*, 2011; Monier *et al.*, 2011; Piel *et al.*, 2011). In the explored metagenomic libraries, the gene(s) of interest may be present at a low frequency. To circumvent this limitation, two main different strategies were implemented, such as : (i) the development of cloning vectors that allow a positive selection or an easiest screening; and (ii) the enrichment of a microbial community with a biological function of interest under appropriate conditions (see an example in Gabor *et al.*, 2004 and a review by Taupp *et al.*, 2011). With respect to QS, functional metagenomics extended knowledge of the diversity of the NAHL-producing and NAHL-degrading enzymes (Riaz *et al.*, 2008; Schipper *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2010; Bijtenhoorn *et al.*, 2011a and 2011b, Faure *et al.*, 2011). This approach also revealed biosynthesis of novel mimics which activate QS-response (Guan *et al.*, 2007).



**Fig.1. Characteristics of cultured populations in GCL-treated plant cultures and untreated plant control.**

Potato plants were cultivated under hydroponic conditions during 42 days, and treated with GCL at 0.4 g/L (vertical arrows) at day 1 (batch T1) and day 1 and day 28 (batch T2). A third batch was used as an untreated control (A). Total cultivable bacteria (B), and percentage of NAHL-degraders (C) and NAHL-producers (D) in the T1, T2, and untreated batches were estimated at day 42. The mean of three replicates are shown. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

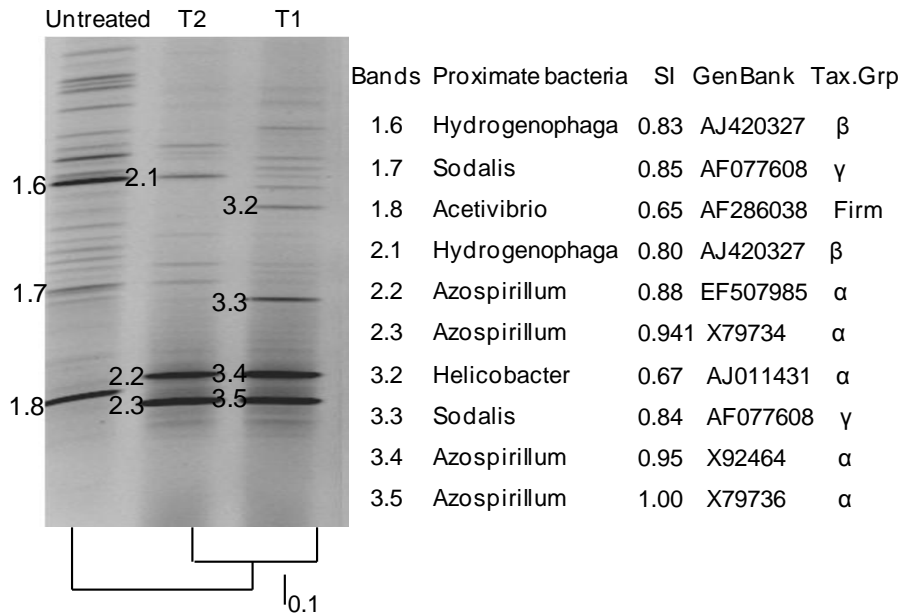
In this work, a previously described strategy (Cirou *et al.*, 2007; Cirou *et al.*, 2011) was used to increase the percentage of QQ-bacteria in plant environments by the introduction of biodegradable compounds structurally related to NAHL such as  $\gamma$ -caprolactone (GCL). The GCL-induced bias on the bacterial diversity was evaluated by a combination of *rrs*-DGGE and *rrs*-pyrosequencing approaches. Furthermore, functions involved in NAHL degradation were investigated using a metagenomic approach. DNA extracted from a microbial community strongly stimulated by the addition of GCL was used to construct a 29,760-clone library (ca. 1.5 Gbp) that was screened for QQ-activity. A *qsdB*-encoded NAHLase was identified and characterized. This work is a first report of NAHLase that belongs to the amidase signature (AS) family, members of which are usually involved in the degradation of diverse xenobiotic compounds, including nylon and herbicide linuron.

### 3 Results

#### 3.1 GCL-mediated biostimulation of NAHL-degrading bacteria

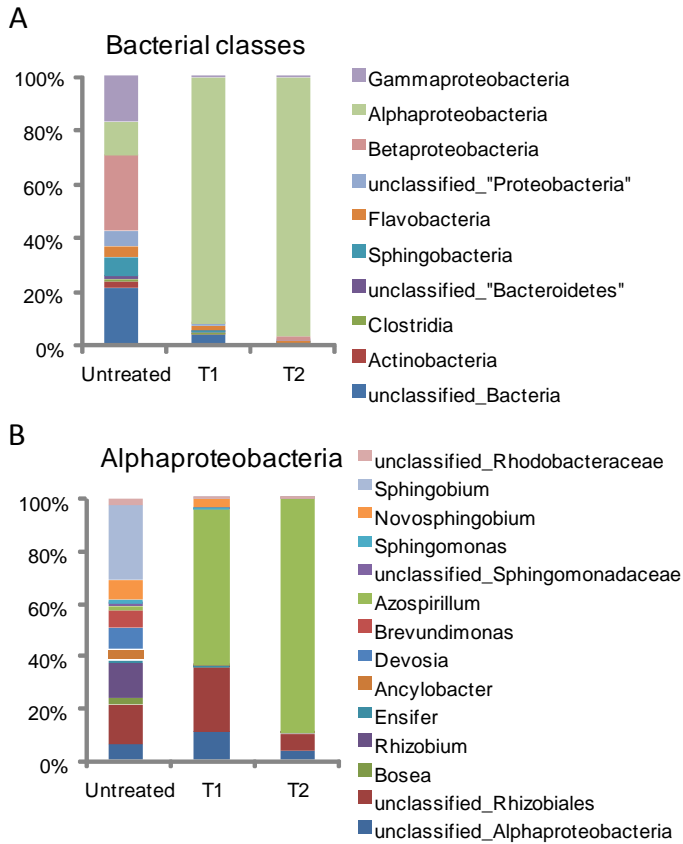
GCL treatment was used to increase the abundance of NAHL-degrading bacteria, thus modifying the structure of the bacterial community in hydroponic cultures of *Solanum tuberosum* var. Allians. GCL was introduced once (0.4g/L at day 1) or twice (0.4g/L at day 1 and day 28) in T1 and T2 batches, respectively. A third batch was used as an untreated control (Fig. 1A). Each of the batches contained one hundred plants and 13 liters of nutritive solution. At day 42, cultured bacteria (CFU/g of fresh root) were significantly more abundant in the T2 batch than in the T1 and control batches (Fig. 1B). Among cultured bacteria, the ratio of NAHL-degrading bacteria reached 3% in control batch, and 9% and 36% in the T1 and T2 treated batches, respectively (Fig. 1C). In contrast, no modification of the percentage of NAHL-producing bacteria was observed in the different batches (Fig. 1D).

Using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) approach, GCL concentrations were measured in nutritive solutions and plant tissues of untreated and GCL-treated plant cultures at day 42. While GCL was introduced at 0.4 and 0.8 g/L in T1 and T2 batches, it was detected at day 42 at  $0.7 \cdot 10^{-4}$  g/L and  $3.2 \cdot 10^{-4}$  g/L in the nutritive solution of T1-batch and T2-batch, respectively, and at  $0.7 \cdot 10^{-4}$  mg/g and  $4.9 \cdot 10^{-4}$  mg/g of fresh weight in plant tissues recovered from T1-batch and T2-batch, respectively. GCL was undetectable in the untreated samples. These data clearly correlate growth stimulation of NAHL-degrading bacteria with degradation of the introduced GCL.



**Fig.2. *rrs*-DGGE of the GCL-treated and untreated plant cultures**

DGGE analyses were performed on samples collected at day 42 from untreated, T1 and T2 batches. Numbered bands were analyzed by sequencing. For each sequence, one of the closest *rrs* sequences was indicated and characterized by the name and taxonomical position of the bacteria of origin (Firm, Firmicutes;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Proteobacteria;  $\beta$ ,  $\beta$ -Proteobacteria;  $\gamma$ ,  $\gamma$ -Proteobacteria), the similarity index (SI) that was calculated at Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), and its GenBank number.



**Fig.3. *rrs*-pyrosequenced diversity of bacteria in GCL-treated and untreated plant cultures**

The *rrs*-pyrosequencing on samples collected at day 42 from untreated, T1 and T2 batches permitted the identification of the bacterial classes (A), and that of the genera among the alphaproteobacteria (B) in each of the batches. The number of analyzed sequences was 36847, 74891, and 50113 for the untreated, T1 and T2 samples, respectively.





### 3.2 The *rrs*-analyses revealed a drastic reshaping of bacterial diversity

GCL-mediated modifications of bacterial diversity in plant environment were explored by *rrs*-DGGE and *rrs*-pyrosequencing. After 42 days, total DNA of bacterial cells collected from the nutritive solution was extracted and used as a template for *rrs*-amplifications. DGGE profiles revealed a drastic remodeling of bacterial populations after GCL treatments (Fig. 2). Under GCL-treated conditions, major bands identified by sequencing were generated from members of the *Azospirillum* genus, while in untreated control they originated from members of the genera *Hydrogenophaga* and *Acetivibrio*.

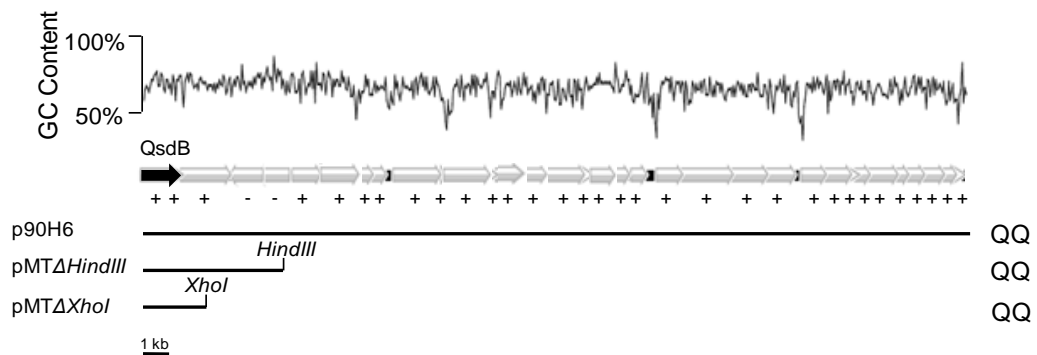
*rrs*-pyrosequencing gave a deeper view of bacterial community and confirmed the high abundance of *Azospirillum*-related bacteria in the GCL-treated samples (Fig. 3). All 161,851 usable sequences generated by pyrosequencing were analyzed by hierarchical clustering to define clusters at 97% sequence identity. These served as Operational Taxonomy Units (OTUs) for calculations of Chao1 and Shannon indexes. In the untreated samples, cluster number reached 834, whereas it was only 467 and 271 in GCL-treated samples T1 and T2, respectively. Similarly, the Chao1 and Shannon values were higher in the untreated sample (1204 and 4.03, respectively) than in treated samples T1 (733 and 2.80) and T2 (397 and 1.94). These data indicate that GCL-treatment strongly stimulated the growth of a limited number of OTUs, and hence reduced the diversity of the resident community.

Diversity analysis of the GCL-induced bias was refined by identifying and comparing *rrs*-sequences at the class and genus levels using tools available from the Ribosomal Database Project Website (Fig. 3). While alphaproteobacterial *rrs*-sequences dominated in GCL-treated samples (more than 95%), those identified in the untreated samples belonged mostly to *betaproteobacteria* (26%), unclassified bacteria (21%) and *gammaproteobacteria* (18%) (Fig. 3A). More precisely, *Azospirillum* appeared as the dominant genus that represented up to 60% and 92% of the identified *Alphaproteobacteria* in T1 and T2 samples, respectively (Fig. 3B). Contrasting with the above observation on GCL-treated samples, the alphaproteobacterial diversity of untreated batch samples was larger, with more than 10 genera of which emerged *Sphingobium* (30%) and *Rhizobium* (15%) (Fig. 3B).

As a whole, the bacterial community of plant batches under GCL-treatment exhibited a strong bias in terms of diversity especially in the plant environment conditioned by two GCL-treatments (T2). This bias was observed both at the genus level because of dominance of *Azospirillum*-related sequences, and at a functional level because of a significant increase of

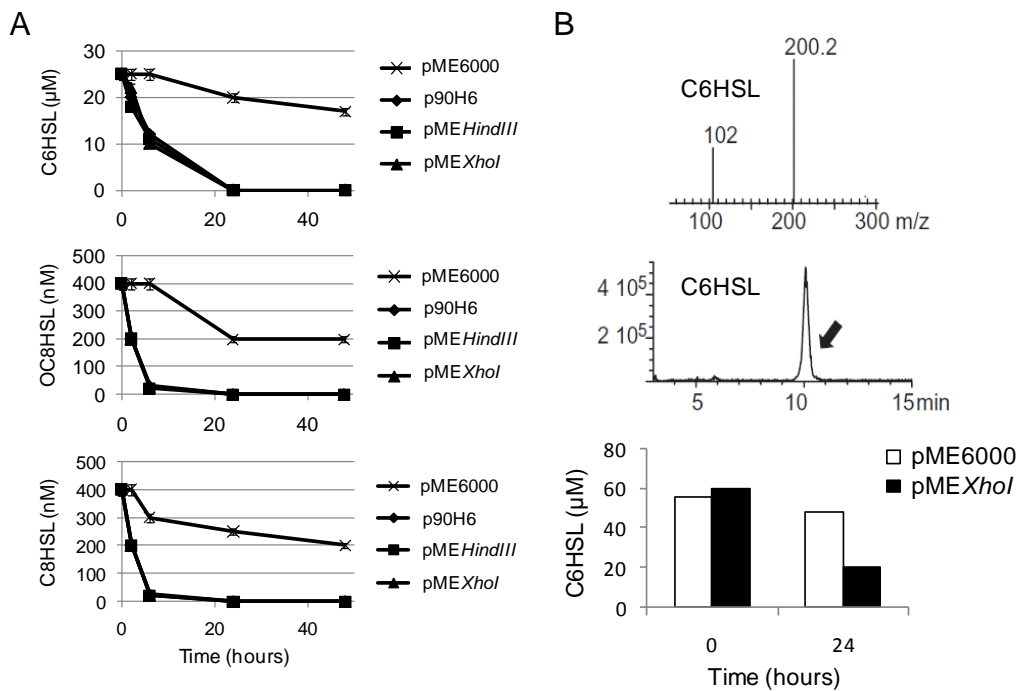
**Table 1: ORFs of the p90H6 DNA-insert**

ORF n°	Peptide length	Determined and/or hypothetical function	Accession n°	Organism	Phylum
1	479	Amidase	YP_372308.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	Proteobacteria
2	117	Inner-membrane translocator	YP_001264838.1	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	Proteobacteria
3	719	Hypothetical protein	YP_001264839.1	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	Proteobacteria
4	438	Hypothetical protein	NP_901586.1	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 35937	Proteobacteria
5	424	Cobalamin biosynthesis CobW-like domain-containing protein	YP_002798347.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
6	388	Acetyl-CoA acetyltransferase	YP_524523.1	<i>Rhodoferrax ferriducens</i> T118	Proteobacteria
7	509	AMP-dependent synthetase and ligase CoA	YP_524524.1	<i>Rhodoferrax ferriducens</i> T118	Proteobacteria
8	240	Succinyl-CoA—3-ketoacid-CoA transferase subunit A	YP_001854087.1	<i>Kocuria rhizophila</i> DC2201	Actinobacteria
9	211	3-oxoacid CoA-transferase subunit B	YP_001235372.1	<i>Acidiphilum cryptum</i> JF-5	Proteobacteria
10	674	σ54-dependent activator protein	YP_002798346.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
11	60	No match	-	-	-
12	645	Acetophenone carboxylase	YP_002798345.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
13	132	Acetophenone carboxylase subunit γ	YP_002798344.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
14	436	Acetophenone carboxylase	YP_002798343.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
15	412	Acetophenone carboxylase	YP_002798343.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
16	620	Hydantoinase B / oxoprolinase	YP_001416247.1	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	Proteobacteria
17	118	Acetophenone carboxylase	YP_002798342.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
18	285	Hypothetical protein	YP_002798341.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	Proteobacteria
19	167	Zinc/iron permease	ZP_08503466.1	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5	Proteobacteria
20	183	No match	-	-	-
21	338	Hypothetical protein	YP_159683.1	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Proteobacteria
22	794	RND superfamily exporter	YP_159684.1	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Proteobacteria
23	516	Transcriptional regulator LysR	YP_159685.1	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Proteobacteria
24	436	Hypothetical protein	YP_0001020138.1	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	Proteobacteria
25	321	Amidase	YP_003451629.1	<i>Azospirillum</i> sp. B510	Proteobacteria
26	387	Hypothetical protein	YP_004590677.1	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	Proteobacteria
27	119	Hypothetical protein	EGC94464.1	<i>Escherichia fergusonii</i> ECD227	Proteobacteria
28	173	Hypothetical protein	ABY62766.1	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteobacteria
29	421	Ring hydroxylating subunit alpha (lacC)	YP_002381972.1	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	Proteobacteria
30	158	Aromatic ring hydroxylating dioxygenase beta subunit (lacD)	ABY62760.1	<i>Pseudomonas putida</i>	Proteobacteria
31	240	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR (lacE)	YP_04381977.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	Proteobacteria
32	320	Ferredoxin (lacF)	YP_04381976.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	Proteobacteria
33	166	Flavin reductase-like protein (lacG)	YP_346445.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	Proteobacteria
34	134	Putative tautomerase	YP_004415698.1	<i>Pusillimonas</i> sp. T7-7	Proteobacteria



**Fig. 4. Simplified map the fosmid p90H6 and sub-cloning of *qsdB***

GC content (%), and orientation (+/-) of the 34 putative *orfs* of the fosmid p90H6, and physical map of plasmids pMTΔ*HindIII* and pMTΔ*XhoI*, both harbouring *qsdB*. When expressed in *E. coli*, all the different plasmids exhibited quorum-quenching activity using C6HSL, C8HSL, and OC8HSL signals.



**Fig. 5. Evidence of NAHL-degradation activity of QsdB by HPLC/MS analysis**

In A, entire cells of *E. coli* strains DH5 $\alpha$  harboring the fosmid p90H6, the empty vector pME6000, and the pME6000 derivatives pMT $\Delta$ HindIII and pMT $\Delta$ XhoI were incubated with C6HSL (25 $\mu$ M), OC8HSL (400 nM) or C8HSL (400 nM). Residual NAHL concentrations were determined using appropriated NAHL biosensors. In B, cell extracts of *E. coli* strains DH5 $\alpha$  (pME6000) and DH5 $\alpha$  (pMT $\Delta$ XhoI) were incubated with 50 $\mu$ M C6HSL. The medium was analyzed at 0 and 24h by HPLC/MS. Mass spectrum of pure C6HSL (M+H  $m/z$  of 200) and retention time of C6HSL (10.1min) are shown along with a time course evolution of C6HSL concentration in the incubation medium.

the abundance of NAHL-degrading bacteria. Bacterial community of the strongest biased T2-condition was chosen for metagenomic study.

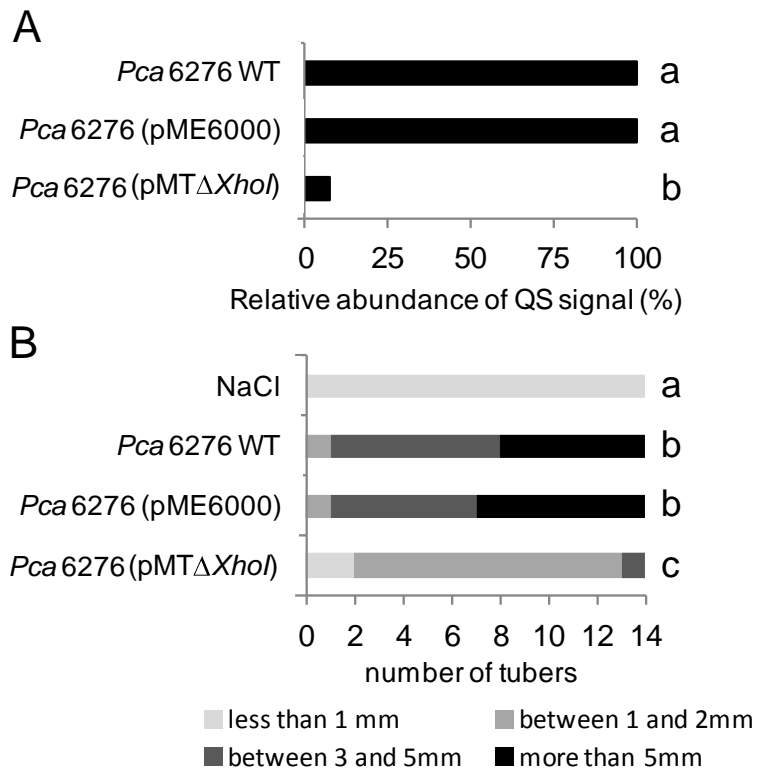
### 3.3 Identification of a metagenomic fosmid expressing QQ-activity

Bacterial DNA was extracted from the GCL-treated batch T2, and used to construct a metagenomic library of 29 760 fosmids, each of which exhibited a DNA insert of 40 to 50 kbp. Hence, the metagenomic library represented up 1.5 Gbp of environmental DNA. All metagenomic clones were individually tested for their capacity to disrupt QS using hexanoyl-homoserine lactone (C6HSL) as a signal and *Chromobacterium violaceum* CVO26 as a bacterial biosensor. A single fosmid, p90H6, conferring NAHL-degradation ability was identified and sequenced.

The fosmid p90H6 contains an insert of 39,632 bp (accession number: JQ292794) encoding 34 complete ORFs (Fig. 4). The GC content of the DNA sequence reached a mean value of 67.2 %, and appeared to be roughly stable throughout the whole insert, though some GC% differences could be seen in between some ORFs. Protein sequence comparison of all the deduced ORFs was performed using BLAST searches upon available sequences in GenBank database. This analysis revealed that 31 of the 34 ORFs showed highest similarity with known or predicted proteins from bacteria belonging to the class of *Proteobacteria* (Table 1). Furthermore, phylogenetic analyses were carried out for each of the 34 ORFs to reinforce the BLAST search. Phylogenetic trees confirmed the relationship between DNA insert of p90H6 and the class of *Proteobacteria*. It remained difficult, however, to assign a more precise taxonomic affiliation to this insert. Interestingly, two putative operons were identified. The first one, of 7 *orfs* could be involved in metabolism of acetophenone-related compounds; the second, which encompasses 10 *orfs*, in the catabolism of the plant hormone indole-3-acetic acid. Another remarkable feature was the similarity of *orf1*, located immediately downstream the *lacZ*-promoter of p90H6, with amidases or putative amidases (Table 1).

### 3.4 *qsdB* encodes NAHLase activity

The *orf1* was therefore tested as a candidate gene responsible for above detected NAHLase activity. To this end, two plasmids, pMT $\Delta$ *HindIII* and pMT $\Delta$ *XhoI* harboring *orf1* on 4.5 kbp and 2.3 kbp inserts, respectively, were constructed (Fig. 4). Their ability to confer inactivation of NAHL upon *E. coli* host was evaluated (Fig. 5). Using QS-signals C6HSL, 3-



**Fig. 6. QsdB-mediated quorum-quenching in *P. carotovorum***

In A, relative abundance of NAHLs (OC8HSL as the main QS-signal) in wild-type *P. carotovorum* CFBP6276 (*Pca*6276), and *P. carotovorum* harboring the empty vector pME6000 and expressing *qsdB* gene on the pMT $\Delta$ *XhoI* plasmid. B, Symptoms on potato tubers (n=14), which were inoculated with *Pca*6276, *Pca*6276 (pME6000), *Pca*6276 (pMT $\Delta$ *XhoI*), or NaCl 0.8% as a control, were classified according to their importance (see material and methods) and compared using Kruskal-Wallis test (P<0.05). Different letters indicate statistical differences between the compared plant pathogens.

oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8HSL) and octanoylhomoserine lactone (C8HSL) and appropriate bacterial biosensors *C. violaceum* CVO26 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pZNL4), we observed that *E. coli* cells harbouring p90H6, pMT $\Delta$ *HindIII* or pMT $\Delta$ *XhoI* were able to inactivate more than 95% of the introduced NAHL in less than 24 hours (Fig. 5A).

To confirm this result, the disappearance of C6HSL molecule was also investigated by HPLC-MS. After 24 hours incubation with 50  $\mu$ M of C6HSL, C6HSL was detected at a lower level in the assay performed with cell extracts from the strain harboring the pMT $\Delta$ *XhoI* plasmid than in the assay performed with extracts from the control strain harboring the empty vector (fig. 5B). All the above results strongly indicate that the 2.3 kb fragment harbors the gene *qsdB* responsible for NAHL degradation.

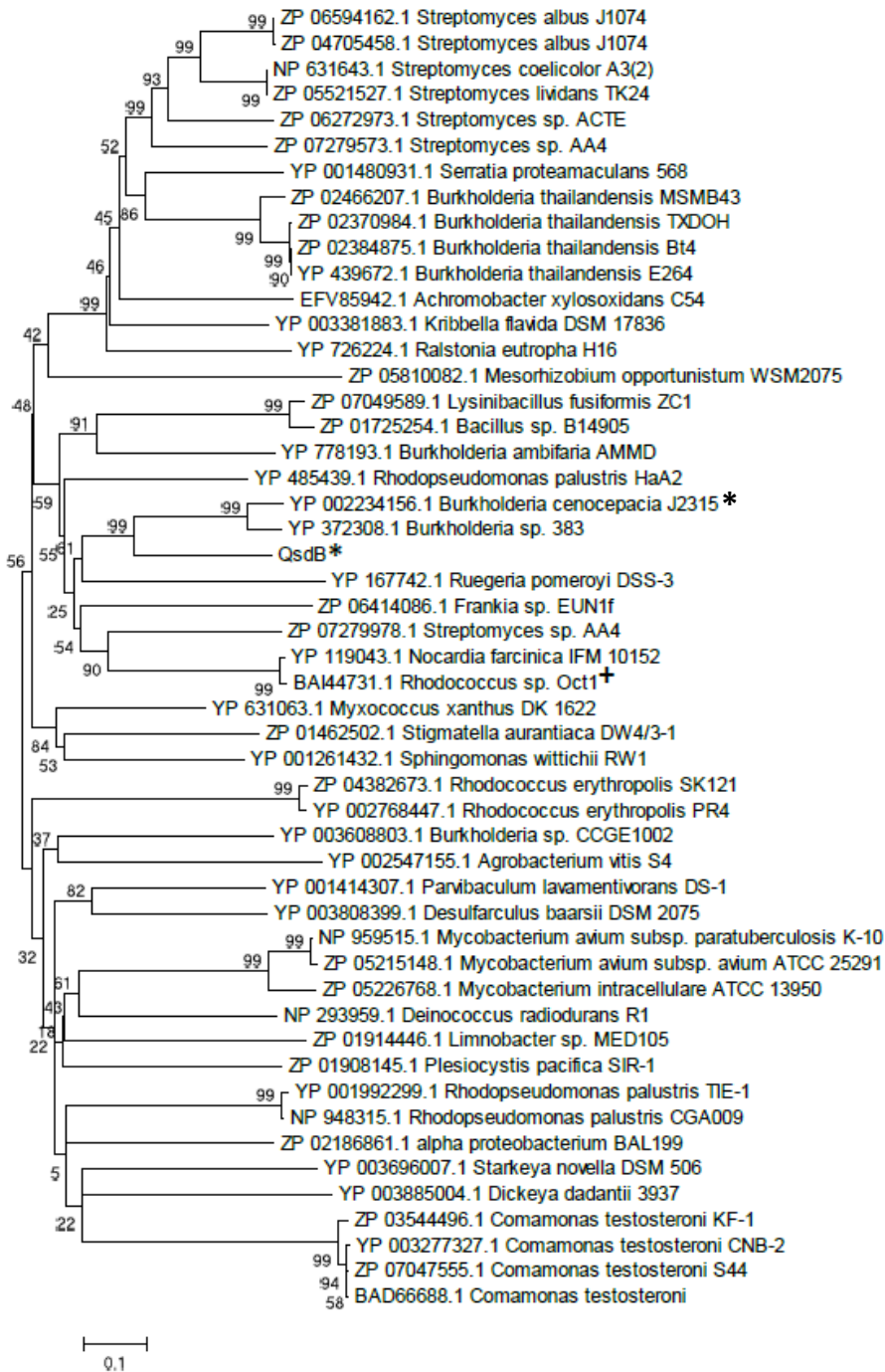
### 3.5 *qsdB*-mediated quorum-quenching in the plant pathogen *Pectobacterium*

Empty vector pME6000 and its derivative pMT $\Delta$ *XhoI* were introduced by electroporation into *P. carotovorum* CFBP6276, in which expression of virulence factors is controlled by QS with OC8HSL as a major signal (Smadja *et al.*, 2004). Expression of *qsdB* reduced the NAHL level in culture supernatant of *P. carotovorum* 10 fold (Fig. 6A). Moreover, potato tubers inoculated with *P. carotovorum* that expresses *qsdB* exhibited symptoms less pronounced than those observed in tubers inoculated with a wild type *P. carotovorum* strain or its derivative harboring the empty vector pME6000 (Fig. 6B). The expression of QsdB therefore appears to efficiently quench the QS-controlled virulence of the plant pathogen *P. carotovorum*.

### 3.6 QsdB belongs to the amidase signature (AS) family

QsdB showed no homology with other known NAHLases belonging to families of Zn-hydrolases, phosphotriesterases, beta-lactam acylases, and short-chain reductases (Uroz *et al.*, 2009; Bijtenhoorn *et al.*, 2011b). In contrast, phylogeny of QsdB and 50 homologous proteins (Fig. 7) revealed that QsdB was closely related to two predicted proteins of the AS family in *Burkholderia cenocepacia* J2315 (63% identity) and *Burkholderia* sp. 383 (63% identity), and to the well known AS enzyme OctHD (47% identity) that is involved in the hydrolysis of omega-octalactam (Fukuta *et al.*, 2010). A search on PROSITE database (<http://prosite.expasy.org/>) confirmed the presence of the typical AS motif (PS00571) in QsdB and its *Burkholderia* orthologs (Fig. 8A). Alignment of the AS signature of well-known





### Fig. 7. Phylogeny of QsdB and its closely relatives

Phylogeny of QsdB and 50 relatives collected from the NCBI non-redundant protein data base was constructed by the neighbour-joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3000 replicates) is shown next to the branches. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 75% bootstrap replicates were collapsed. Asterisks indicate quorum-quenching activity exhibited by QsdB and its ortholog in *B. cenocepacia* J2315, while a cross indicates amidase activity on omega-octalactam in *Rhodococcus* Oct1.

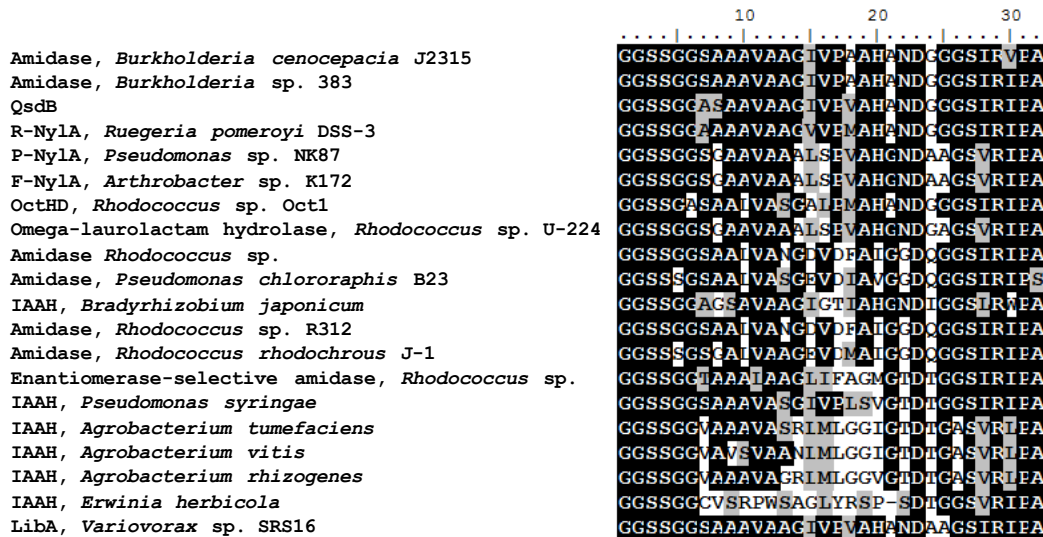
AS-family members allowed the proposition of a consensus pattern which is rich in glycine, serine, and alanine residues.

Phylogenetical analysis of representative members of the AS family (Fig. 8B) revealed the occurrence of three main clusters : the first one encompassed the indole-3-acetamide hydrolases from different plant pathogens such as *Pseudomonas* and *Agrobacterium*; the second group gathers amidases from *Rhodococcus* and *Pseudomonas*; and the third one enzymes accepting a wide range of substrates, such as NylA proteins from *Rugeria*, *Arthrobacter* and *Pseudomonas*, omega-lauro lactam and omega-octalactam hydrolases from *Rhodococcus*, the linuron-degrading enzyme LibA of *Variovorax*. The NAHLase QsdB falls into this last group. Within the predicted *Burkholderia* QsdB-related proteins, which in association with QsdB clearly delineated a phylogenetical sub-cluster (Fig. 8B), one ortholog originated from the human pathogenic *B. cenocepacia* strain J2315 (Holden *et al.* 2008). Whether this ortholog encodes a QS-signal quenching activity was investigated. Disappearance of the NAHL signals C6HSL and OC8HSL was observed in *E. coli* cells expressing this gene, a feature that indicates that two related proteins of the AS family, *i.e.* QsdB and its ortholog in *B. cenocepacia* J2315, exhibit NAHLase activity.

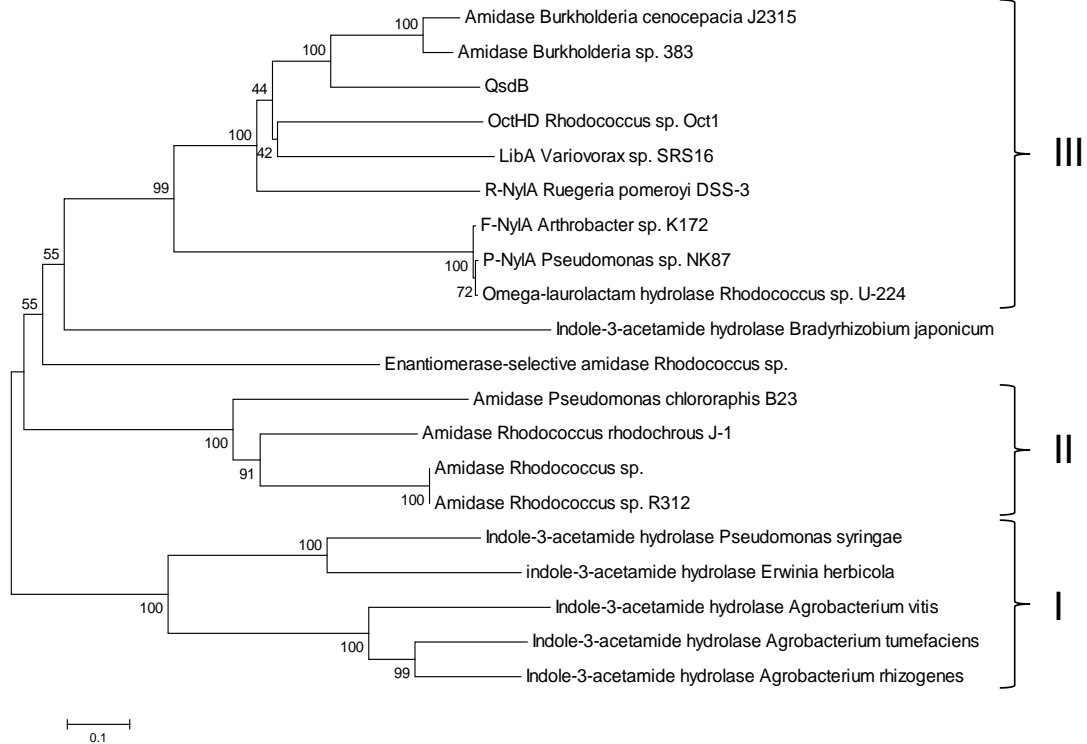
### 3.7 Relative abundance of *qsdB* in bacterial community

Relative abundance of genes encoding NAHL-degradation was quantified by qPCR in the DNA extracted from the GCL-treated and untreated batches. These genes were *qsdB* from an unknown *Proteobacteria* (this work), *qsdA* from *Rhodococcus erythropolis* (Uroz *et al.*, 2008), and *attM* from *Agrobacterium* and related *alphaproteobacteria* (Zhang *et al.*, 2002). The lowest level of *attM* in the untreated condition was arbitrary chosen as a reference level (=1), which was used to calculate the relative abundance of *attM*, *qsdA*, and *qsdB* in the three compared conditions (Fig. 9). The level of *qsdB* and *attM* was higher in batch T2, which was conditioned by a double GCL-treatment, than in T1 and untreated batches. In contrast, the relative abundance of *qsdA* was lower in T2 and untreated batches than in T1 batches. This qPCR analysis revealed the high abundance of the novel QQ-encoding gene *qsdB* in plant environment as compared to that of previously identified *attM* and *qsdA* genes, and its variation according the intensity of the GCL treatment.

A

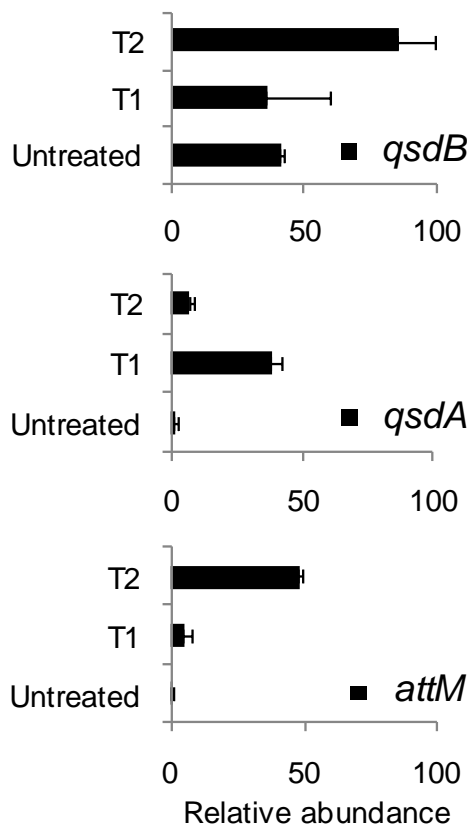


B



**Fig. 8. Phylogeny of the AS family**

In A, alignment of the amidase signature of QsdB and other enzymes or putative enzymes of the AS family. In B, phylogenetic tree of 20 AS-family members: QsdB from the metagenomic fosmid p90H6 and NAHLase from *Burkholderia cenocepacia* J2315 (YP\_002234156.1); putative NAHLase from *Burkholderia* sp.383 (ABB11664.1); amidases from *Rhodococcus* sp. (M74531), *Pseudomonas chlororaphis* B23 (P27765), *Rhodococcus* sp. R312 (P22984); putative amidase from *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (S38270); 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolases P-nylA from *Pseudomonas* sp. NK87 (P13397), F-nylA from *Arthrobacter* sp. K172 (P13398); putative 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase, R-NylA from *Ruegeria pomeroyi* (YP\_167742.1); Omega-octalactam hydrolase, OctHD from *Rhodococcus* sp. Oct1 (BAI44731.1); Omega-lauro lactam hydrolase from *Rhodococcus* sp. U224 (BAG70960.1); Enantiomerase-selective-amidase from *Rhodococcus* sp. (AAA26183.1); IAAH, indoleacetamide hydrolase from *Erwinia herbicola* (L33866); putative IAAH from *Bradyrhizobium japonicum* (P19922), *Pseudomonas syringae* (P06618), *Agrobacterium tumefaciens* (P25016), *A. vitis* (Q04557), and *A. rhizogenes* (Q09102). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.



**Fig. 9. Relative abundance of NAHL-degradation genes in GCL-treated and untreated batches**

Relative abundances of the *qsdB*, *qsdA* and *attM* genes in GCL-treated batches T1 and T2 and untreated batch at day 42 were measured by qPCR using *attM* intensity under the untreated condition as a normalized reference (arbitrary value = 1).



## 4 Discussion

Discovery of the NAHLase QsdB encoded by a 39-kb environmental-DNA fragment, and that of its ortholog in the genome of *B. cenocepacia* J2315, revealed the occurrence of QS-signal degradative activity among the AS-family enzymes and, as a consequence, extended diversity of bacterial QQ-enzymes. Remarkably, the identification of the *qsdB*-ortholog in *Burkholderia* could only be possible by combining data collected from functional metagenomics and those provided by whole genome sequencing of the *Burkholderia* isolates J2315 and 383 (Genomes NC\_011001 and NC\_007511.1; Tárraga *et al.* 2009). This work therefore exemplified the power of functional metagenomics for the discovery of unexpected functions in uncultured bacteria as well as in already-known bacterial genomes. In *Burkholderia*, QsdB could be involved in the utilization of NAHL as a source of carbon or energy (Yang *et al.*, 2006) or, because *Burkholderia* may also produce NAHL (Coenye *et al.*, 2007), in the fine modulation of QS signaling. Such role had been described in other bacteria such as *Agrobacterium* (Zhang *et al.*, 2002; Haudecoeur *et al.*, 2009a and 2009b). The precise function of *qsdB* in *Burkholderia* remains to be explored.

QsdB enzyme is distantly related to the previously identified NAHLases, such as lactonases AiiA, AttM/BlcC, AhlD, and QlcA which belong to the Zn-hydrolase family (Dong *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Carlier *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003, Riaz *et al.*, 2008), the lactonase QsdA to the phosphotriesterase family (Uroz *et al.*, 2008), the amidases AiiD, PvdQ, AhlM, AiiC, and QuiP from the amidohydrolase cluster of the beta-lactam acylases (Lin *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2003, Park *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2008), and the reductase BpiB09 that belongs to the short-chain reductase family (Bijtenhoorn *et al.*, 2011b). By contrast, the QQ-enzyme QsdB and its ortholog in *B. cenocepacia* J2315 showed the typical AS-signature, and their sequences fall into a clearly-defined sub-cluster within the AS-family (Fig. 8B). This sub-cluster encompasses well-known enzymes, such as NylA, OctHD, and LibA that are all involved in degradation of xenobiotic compounds. The 6-amino-hexanoate-cyclic-dimer hydrolases NylA of *Pseudomonas* and *Arthrobacter* (Kanagawa *et al.*, 1989), and the omega-octalactam hydrolases of *Rhodococcus* contribute to transformation of nylon-associated compounds (Fukuta *et al.*, 2010), while LibA of *Variovorax* was involved in degradation of the herbicide linuron (Bers *et al.*, 2011). To our knowledge, QsdB is the first enzyme of the NylA-OctHD-QsdB-LibA sub-cluster to be involved in the degradation of natural compounds, i.e. NAHL. One can hypothesize that QsdB-related NAHLases would be ancestors from which had evolved the enzymes cleaving



structurally-related xenobiotics, such as linuron and nylon. Indeed, the structure of linuron exhibits some similarity with that of NAHL (Bers *et al.*, 2011). The pre-existing skeleton of NAHLase could explain, in part, why nylon- and linuron-degrading enzymes had rapidly emerged in microbial community even such compounds had been only recently introduced in the soil as a consequence of industrial and agricultural activities (Okada *et al.*, 1983; Tsuchiya *et al.*, 1989). Such evolved genes could be thereafter propagated by horizontal transfer (Okada *et al.*, 1983). Even though the hypothesis of a NAHLase-ancestor of the nylon and linuron-degradative enzymes appears attractive, we cannot exclude fortuitous similarities between substrate range and amino acid sequences of these proteins.

The *QsdB*-encoding gene belongs to a large environmental-DNA insert of which most of the ORFs (31/34) were phylogenetically associated to *Proteobacteria*. These are the dominant bacterial phylum identified by *rrs*-DGGE and *rrs*-pyrosequencing in the samples used for the construction of the metagenomic library. A refined analysis would suggest that it belongs to a *gammaproteobacteria* or *betaproteobacteria*, even though this assignment remains uncertain because none of the known genomes robustly matches with the metagenomic DNA. In addition to *qsdB*, this environmental DNA harbored two remarkable regions, from orf12 to orf18 and from orf25 to orf34, which could be involved in the metabolism of acetophenone-related compounds and indole-3-acetic acid (IAA). Nine of the 10 genes which are known to be involved in the catabolism of IAA are present in the fosmid p90H6; and synteny of the p90H6 IAA-genes designated *gammaproteobacteria* as the closer bacteria (Leveau *et al.*, 2008). However, the presence of genes involved in the IAA catabolism also suggests that the trapped environmental DNA could belong to a plant-associated bacterium. This feature is in line with the rhizospheric origin of the analyzed community.

Relative abundance of *qsdB* and two other NAHLase-encoding genes, *attM* which is common in *Agrobacterium*-related *alphaproteobacteria* (Zhang *et al.*, 2002, Carlier *et al.*, 2003, Funami *et al.*, 2005, Riaz *et al.*, 2008), and *qsdA*, which is associated to *Actinobacteria* of the species *Rhodococcus erythropolis* (Uroz *et al.*, 2008), was investigated by qPCR in total DNA recovered from untreated and GCL-treated bacterial communities. Variations of these gene-specific markers should be interpreted in the context of *rrs*-diversity of total bacteria community. The reference gene *attM* correlated with abundance of the *alphaproteobacteria*; the abundance of *qsdA* and *qsdB* correlated with an increase of the percentage of bacteria degrading the NAHL signal in GCL-treated communities; and, finally,





abundance of *qsdB* was higher in the twice-treated samples (T2) than after a single treatment (T1). Noticeably, the level of *qsdB* was, in average, higher than that of *qsda* and *attM*, suggesting that this novel QQ-encoding gene could play a significant role in the NAHL signal disruptive activity of the plant-associated bacterial community.

## 5 Experimental procedures

### 5.1 Plant culture

One hundred plants of *S. tuberosum* var. Allians, which were recovered from cultures performed under axenic conditions, were placed into holes (3 cm space to each other) of batch covers. Each of the non-sterile batches (40 x 60 x 8 cm) contained 13 L of the nutritive solution Hydrobloom (Cellmax, UK) with nitrogen at 0.80 g/L, phosphore at 0.56 g/L and potassium at 1.48 g/L as major components. The solution was diluted from a concentrated stock solution (x250) with non-sterile water from the public water system. Planted batches were placed in the greenhouse (Comité Nord Plants de Pomme de Terre, Bretteville-du-Grand-Caux) under natural light at 10–15°C (night) and 25–30°C (day). Pure gamma-caprolactone (GCL), also termed 5-ethylidihydro-2(3H)-furanone or 4-hexanolide or gamma-hexalactone (CAS # 695-06-7) was purchased from Sigma-Aldrich. A single GCL-treatment (0.4 g/L) was performed in the T1-batch at day 1, while the T2-batch received two treatments of 0.4 g/L at day 1 and day 28. A third batch was used as an untreated control. All the 3 batches (untreated, T1 and T2) were simultaneously analyzed at day 42.

### 5.2 Identification of bacterial isolates for NAHL-production and NAHL-degradation

At 42 days, one gram of roots (fresh weight) was suspended in 10 ml of sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub>, diluted and spread onto TSA medium (AES) for counting members of the (total) culturable bacterial community. Three samples were analyzed from each batch. From each of the nine samples, thirty TSA-isolates were grown in 96-microwell plates and individually assayed for production of NAHL with the *A. tumefaciens* biosensor NT1(pZNL4) (Cha *et al.*, 1998). All isolates were also assayed for their capacity to disrupt perception of the QS-signal C6HSL using the biosensor *C. violaceum* CVO26 (McClellan *et al.*, 1997).

### 5.3 DNA extraction from bacterial community

At day 42, 10 L of nutritive solution from each of the batches was filtrated through a filter paper to eliminate large plant debris, then centrifuged at 17600 g. Total genomic DNA



was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and quantified with a spectrophotometer (NanoDrop ND1000, Labtech, France).

#### 5.4 *rrs*-DGGE

PCR-amplicons of the *rrs* 5'-region between positions 341 and 534 (according to *E. coli* sequence) were submitted to DGGE analysis, which was performed by Microbial Insights (Rockford, TN, USA) as previously described (D'Angelo-Picard *et al.*, 2004). Sequence identification of selected bands was performed using the sequence match facility of the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), according to NCBI taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). Furthermore, band position in each line were converted to 0 (absence) and 1 (presence) values and assembled in a matrix. Profile similarity was calculated with the Dice algorithm using DistAFLP software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/microb>).

#### 5.5 *rrs*-pyrosequencing

Experimental procedures for *rrs*-amplification, 454-pyrosequencing, and data analysis were previously described by Cirou *et al.* (2011). Multiple PCR reactions were performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas), and High Fidelity PCR Enzyme (Fermentas), and the modified *rrs*-primers 8F (**BXXXXXXAGAGTTTGATCMTGGCTCAG**) and 357R (**AXXXXXXCTGCTGCCTYCCGTA**), where **B** and **A** represent the adaptors for pyrosequencing (GS20, Roche/454 Life Sciences) and XXXXXX were the 6 nt sequence tags designed for sample identification barcoding. The PCR products were pooled and loaded on a 1% agarose gel in TAE buffer (2mM Tris-acetate pH 8, 5mM Na-EDTA) and purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel). Fifty ng of PCR products from each sample were mixed for pyrosequencing on Roche/454 FLX Pyrosequencer (GATC biotech, Konstanz, Germany). After removal of the tags, the sequences were selected by their length (>150nt) and their quality score (90% of nucleotides with a quality score >25) using the Greengenes website (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), and analyzed at the Ribosomal Database Project Website (<http://rdp.cme.msu.edu/>).



### 5.6 PCR of *qsdA*, *qsdB* and *attM* genes

Relative abundances of the *qsdA*, *attM* and *qsdB* genes in DNA samples from untreated, T1 and T2 batches were estimated by quantitative PCR (qPCR) in 96-well plates using a LightCycler 480 (Roche). Primers were designed for conserved region of the genes *qsdA* (5'-ACGAGCATGTCTTCGTTCTG and 5'-GGATCGACGATCGTGCTGAT), *attM* (5'-TGACATCGGCCGGATCGAAA and 5'-ACGGCGGCAACGCGATTGAA), and *qsdB* (5'-GAGTGCCCAGGAACTTCACG and 5'-CCTTGATCAGGAAGGGCACG), and generated a fragment of ca. 150 bp in length. Calibration curves of *qsdA*, *attM*, and *qsdB* were defined with genomic DNA of *Rhodococcus erythropolis* R138, *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *E. coli* DH5 $\alpha$  harboring the p90H6 fosmid, respectively. Composition of the PCR mix for each sample was as follows: 5  $\mu$ L of SYBER Green I Master Mix (Roche), reverse primer (0.5  $\mu$ M), forward primer (0.5  $\mu$ M) and 1  $\mu$ L of DNA sample at 8 ng/ $\mu$ L. Calculation of the relative abundance of the investigated genes *attM*, *qsdA*, and *qsdB* in batches was normalized according level of *attM* gene in untreated batch and taken in account the variation of DNA concentration in batches.

### 5.7 Construction and screening of the metagenomic library

The metagenomic library was constructed by LibraGen (Toulouse, France) from microbial community collected at day 42 from the GCL-treated T2-batch. DNA was partially digested by Sau3A, and the resulting fragments (40-50 kb) were cloned into the fosmid EpiFos harboring a chloramphenicol-resistance gene, and transferred into *E. coli* DH10B. A total of 29 760 clones constituted the metagenomic library which was distributed in 310 microwell plates. Each clone was individually cultivated in 96-well plates and tested for inactivation of the C6HSL signal (12.5  $\mu$ M), according the previously described procedures (Riaz *et al.*, 2008).

### 5.8 Sequencing and phylogenetical analyses of the identified fosmid p90H6

Complete sequence of the p90H6 fosmid (46 kb) harboring a 39kbp insert conferring NAHL-degradation activity was achieved by Sanger sequencing. To this end, a library of 2.0-2.5 kb fragments was constructed, cloned and sequenced by GATC Biotech (Mulhouse, France). Assembling (7x in average coverage) was performed using DNASTAR Lasergene, and appropriate primers were designed for gap-closure sequencing. DNA map was generated by Geneious and *orf* determination by Bioedit softwares.



For each of the putative proteins encoded by the p90H6 insert, 50 homologous sequences were retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) after identification by BLASTp (Altschul *et al.*, 1997). Multiple sequence alignments were carried out with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou *et al.*, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (3000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein *et al.*, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei *et al.*, 2000) and are in the units of the number of base differences per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura *et al.*, 2007).

### 5.9 NAHL-degradation assays

The pMT $\Delta$ *HindIII* and pMT $\Delta$ *XhoI* plasmids were pME6000 derivatives harbouring a 4.5 kb and 2.3 kb *qsdB*-insert, respectively. Overnight cultures of *E. coli* strain DH5 $\alpha$  harboring the p90H6, pME6000 empty vector or the two plasmids pMT $\Delta$ *HindIII* and pMT $\Delta$ *XhoI* were adjusted at OD<sub>600nm</sub> 2 and were incubated at 37°C with C6HSL at 25 $\mu$ M, and OC8HSL and C8HSL at 400nM in LBm medium. Assays were performed up to 48 h, and residual NAHL concentration was determined at different times using the NAHL biosensors mentioned above and below. The *qsdB* ortholog of *B. cenocepacia* was amplified using the primers 5'-GCTTCATTCCAGCTTCAGTCA and 5'-GAGGTGCTCGCGATCTACCG, and cloned in pGEMT-Easy vector using *E. coli* DH5 $\alpha$  as a bacterial host.

For HPLC-MS analyses, overnight cultures of *E. coli* strain DH5 $\alpha$  harboring pME6000 or pMT $\Delta$ *XhoI* were centrifuged (30 min at 4°C at 8100 g). Cells were washed twice in KPBS buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.8), and a protease inhibitor cocktail (Sigma P8465) was added before sonication. Following sonication, cell debris were removed by centrifugation (20 min, 4 °C, 14000 g), and the resulting crude cell extract (CCE) was filtered through a polyethersulfone column (10 kDa Vivaspin500). Protein concentration of the CCE was determined using the Bradford method with bovine serum albumin as a standard (Sigma). In NAHL-degradation assay, the reaction mixture contained CCE at a final concentration of 10 g/L and C6HSL at 50  $\mu$ M in a final volume of 1 ml of KPBS buffer. Assays were incubated at 37°C up to 24 h, and residual NAHL concentration was determined using HPLC-MS analysis as described below.





### 5.10 Quantification of NAHL and GCL

NAHL-quantifications were performed on thin layer chromatography silicate plate (C18-reverse phase, Whatman) using biosensors *A. tumefaciens* NT1(pZNL4) (Cha *et al.*, 1998) and *C. violaceum* CVO26 (McClellan *et al.*, 1997), and pure C6HSL and OC8HSL as standards.

For HPLC-MS analysis, samples collected from GCL-treated plant cultures and HHL-degradation assays were filtered through a polyethersulfone column (10 kDa Vivaspin500). 30 to 50  $\mu$ L were analyzed by HPLC (Waters Alliance 2690) conjugated with LC-MS/MS (Waters ZQ Mass Spectrometer with single quadrupole system and electrospray ionization). To detect GCL, a Waters Sunfire C18 5  $\mu$ m (150 mm x 3 mm) column was eluted by isocratic mixture (80/20) of H<sub>2</sub>O/HCOOH (0.1%) and CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (0.1%). To detect C6HSL, a Gemini C18 5  $\mu$ m (2.0 x 150 mm) column was used with the same isocratic mixture. Quantification was performed according a calibration curve of pure GCL and C6HSL, as described previously (Cirou *et al.*, 2007).

### 5.11 Soft rot tuber assays

Cultures of *Pectobacterium atrosepticum* CFBP6276 and its derivatives harboring the pME6000 and pMT $\Delta$ XhoI plasmids were washed twice in NaCl 0.8%. Fourteen tubers of *S. tuberosum* var. Allians were inoculated with 10<sup>7</sup> CFU of the plant pathogen, and incubated at 25 °C. Five days after infection, the tubers were cut in the middle, and observed. The aggressiveness of the strains was categorized into four classes of diameters of the maceration zone: less than 1mm, between 1 and 2 mm, between 2 and 5 mm, more than 5 mm. The Kruskal–Wallis test ( $\alpha = 0.05$ ) allowed the statistical analysis of the maceration categories.

## 6 Acknowledgments

The authors thank S. An and M. DuBow for their help in the preparation of *rrs*-amplicons. MT was supported by a PhD grant from *Réseau de Recherche sur le Développement Soutenable* (R2DS, *Région Ile-de-France*), ABC by a post-doctoral fellowship from *Comité Nord Plants de Pommes de Terre* (CNPPT, France). The researches of YD and DF were funded by *Centre de la Recherche Scientifique* (CNRS) and program *Ecosphère Continentale et Côtière* (EC2CO, CNRS). DF received additional financial supports from the French programs *Ingénierie Ecologique* (CNRS), *Projets innovants* (*Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité*, FRB), and *PESTICIDES* (*Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement*).



## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Bers, K., Leroy, B., Breuglemans, P., Albers, P., Lavigne, R., Sorensen, S.R., *et al.* (2011) A novel linuron hydrolase identified by genomic-proteomic analysis of phenylurea herbicide mineralization by *Variovorax* sp. strain SRS16. *Appl Environ Microbiol* 77:8754-8764.
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., *et al.* (2011a). A novel metagenomic short-chain dehydrogenase / reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6: 262-278.
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., *et al.* (2011b) BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. *J Biotechnol* 155:86-94.
- Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F. (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* 70:1-19.
- 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.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1119–1129.
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., Faure, D. (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol* 9:1511–1522.
- Cirou, A., Raffoux, A., Diallo, S., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. (2011) Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Res Microbiol* 162:945-950.
- Coenye, T. (2010). Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilms and quorum sensing. *Future Microbiol* 5:1087-1099.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Carrier, A., Uroz, S., Raffoux, A., Fray, R., Dessaux, Y. (2004) Dynamics of bacterial populations in the rhizosphere of tobacco plants producing – or not – the quorum sensing signals hexanoyl- and 3-oxohexanoyl-homoserine lactone. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 19–29.



- 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 USA 97: 3526–3531.
- 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, YH, Zhang, XF, Xu, JL, Zhang, LH. (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. Appl Environ Microbiol 70:954-60.
- Faure, D., Tannières, M., Mondy, S., Dessaux, Y. (2011). Recent contributions of metagenomics to studies on quorum-sensing and plant-pathogen interactions. In Metagenomics: current innovations and future trends. D. Marco (ed.). Caister Academic Press, Norfolk (UK), pp 253-263.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- Fukuta, Y., Koizumi, S., Komeda, H., Asano, Y. (2010). A new aryl acylamidase from *Rhodococcus* sp. strain Oct1 acting on octalactams: its characterization and gene expression in *Escherichia coli*. Enzyme and Microb Technol 46:237-245.
- Funami, J., Yoshikane, Y., Kobayashi, H., Yokochi, N., Yuan, B., Iwasaki, K., *et al.* (2005) 4-Pyridoxolactonase from a symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*: cloning, expression, and characterization. Biochim Biophys Acta 1753:234-239.
- 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.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B. (2004) Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. Environ Microbiol 6:948-958.
- Guan, C., Ju, J., Borlee, B.R., Williamson, L.L., Shen, B., Raffa, K.F., Handelsman, J. (2007) Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. Appl Environ Microbiol 73:3669-3676.
- Hao, Y., Winans, S.C., Glick, B.R., Charles, T.C. (2010) Identification and characterization of new LuxR/LuxI-type quorum sensing systems from metagenomic libraries. Environ Microbiol 12:105-117.
- Haudecoeur, E., Tannières, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., Faure, D. (2009a). Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. Mol Plant-Microbe Interact 22:529-537.



- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannières, M., Shelp, B.J., Moréra, S., Faure, D. (2009b). Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci USA 106:14587-14592.
- Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeño-Tárraga AM, *et al.* (2009) The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. J Bacteriol 191:261-77.
- Huang, J. J., Han, J., Zhang, L., 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.
- Kanagawa, K., Negoro, S., Takada, N., Okada, H. (1989) Plasmid dependence of *Pseudomonas* sp. strain NK87 enzymes that degraded 6-aminohexanoate-cyclic dimer. J Bacteriol 171:3181-3186.
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., Janda, K.D. (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.
- Kennedy, J., O’Leary, N.D., Kiran, G.S., Morrissey, J.P., O’Gara, F., Selvin, J., *et al.* (2011) Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. J Appl Microbiol 111: 787-799.
- Leveau, J.H.J., Gerards, S. (2008) Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. FEMS Microbiol Ecol 65:238-250.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., *et al.* (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol Microbiol 47:849-860.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., *et al.* (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology 143: 3703–3711.
- Monier, J.M., Demanèche, S., Delmont, T.O., Mathieu, A., Vogel, T.M., Simonet, P., *et al.* (2011) Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. Curr Opin Microbiol. 14:229-235.
- Nei M., Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.





- Okada, H., Negoro, S., Kimura, H., Nakamura, S. (1983) Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers. *Nature* 16:306:203-206.
- Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Yum, D.Y., *et al.* (2003) AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Micobiology* 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.
- Piel, J. (2011) Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annu Rev Microbiol* 65: 431-4531.
- 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.
- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Camara, M., and Otero, A. (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120 : identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett* 280:73-80.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., and Streit, W.R. (2009) Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75:224-233.
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., Orange, N. (2004) Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant-Microbe Interact* 17:1269-1278.
- 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.
- Taupp, M., Mewis, K., and Hallam, S.J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Curr Opin Biotechnol* 22:465-472.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- Tsuchiya, K., Fukuyama, S., Kanzaki, N., Kanagawa, K., Negoro, S., Okada, H. (1989) High homology between 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolases of *Flavobacterium* and *Pseudomonas* strains. *J Bacteriol* 171:3187-3191.



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

Uroz, S., Dessaux, Y., Oger P. (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBiochem* 26:205-216.

Yang, W.W., Han, J.I., Leadbetter, J.R. (2006) Utilization of homoserine lactone as a sole source of carbon and energy by soil *Arthrobacter* and *Burkholderia* species. *Arch Microbiol* 185:47-54.

Zhang, H.B., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4638:4643.

Zhang, L.H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* 8:238-244.



### **Chapitre III - Etude de la dégradation des signaux QS pour limiter le transfert de plasmide Ti d'un tricheur**

Dans le précédent chapitre, l'impact d'une stratégie de *quorum quenching* contre *Pectobacterium*, phytopathogène de la pomme de terre, sur la diversité des populations bactériennes totales a été analysé. Le criblage d'une banque métagénomique dont l'ADN a été extrait d'une culture hydroponique de pomme de terre a permis l'identification d'une nouvelle enzyme de dégradation des signaux NAHL.

Dans ce chapitre, je me suis intéressée au rôle des enzymes de dégradation des NAHL dans la modulation du niveau de signaux NAHL extracellulaires et par voie de conséquence dans le transfert du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* C58. Pour étudier l'effet de la dégradation des NAHL sur le transfert du pTi, deux souches ne produisant pas de signaux QS (car mutées dans la NAHL-synthétase TraI) et dont la présence d'opines n'est pas nécessaire à l'activation du processus de transfert de pTi ont été utilisées. Ces bactéries qui doivent exploiter les NAHL produites par d'autres bactéries pour transférer leur propre pTi ont été nommées « tricheurs ».

Dans un premier temps, j'ai défini un système permettant la mesure du transfert de pTi de ces tricheurs. Cette première partie de mon travail a demandé des étapes de mise au point conséquentes. Après validation du système, j'ai réalisé des expériences pour étudier l'impact de la dégradation des signaux QS sur leur utilisation par des tricheurs. Différents contextes de dégradation ont été étudiés. Enfin, l'impact de plantes dégradant les NAHL a été évalué sur le transfert de pTi de ces tricheurs *in vitro* et *in planta*.

La souche nommée tricheur-1 (ou Ch1) nous a été donnée par Stephen Farrand (Su *et al.*, 2008). La souche nommée tricheur-2 (ou Ch2) correspond au tricheur-1 exprimant *traM*. Le gène *traM* code la protéine TraM jouant un rôle d'atténuateur de la signalisation QS chez *A. tumefaciens* C58 (Fuqua *et al.*, 1995). Le plasmide pME*traM* construit a été introduit par électroporation dans le tricheur Ch1. Les tabacs transgéniques exprimant la lactonase bactérienne AttM ont été construits par Cathy D'Angelo-Picard (D'Angelo *et al.*, 2011) au sein de notre laboratoire. Toutes les expériences ont été réalisées au laboratoire lors de mon doctorat. Ces résultats servent de matrice à la préparation d'un article, c'est pourquoi les figures et les légendes sont rédigées en anglais.



## 1 Introduction

La signalisation QS impliquant les signaux NAHL régule des fonctions diverses allant de la production de bioluminescence au transfert par conjugaison de facteurs de virulence (Whitehead, 2001). De part leur propriétés de diffusion, des signaux NAHL produits par une bactérie peuvent être utilisés par une autre appartenant ou non à la même population afin d'activer ou de réprimer ses propres fonctions régulées par QS : par exemple chez *Burkholderia* la virulence est augmentée en présence de signaux NAHL produits par *Pseudomonas* lors d'infection de patients (McKenney *et al.*, 1995).

Chez *Agrobacterium tumefaciens* C58, le transfert du plasmide Ti d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice est régulé par *quorum sensing* avec la 3OC8HSL comme signal. La dissémination du plasmide Ti joue un rôle important dans l'écologie des *Agrobacterium*. La plupart des bactéries du genre *Agrobacterium* sont non-pathogènes mais peuvent devenir virulentes par acquisition du plasmide Ti. Cette acquisition permet aux bactéries d'accéder à une nouvelle niche écologique, la tumeur végétale. Chez *Agrobacterium*, la conjugaison du pTi peut contribuer au réarrangement génétique au niveau du pTi (Bouzar *et al.*, 1993), mais aussi au niveau du chromosome (Dessaux *et al.*, 1989). Dans ce contexte de transfert de gènes, une compétition entre les différentes donatrices pour le transfert de leur plasmide Ti vers les bactéries réceptrices peut se mettre place.

*Agrobacterium tumefaciens* C58 code deux lactonases capables d'inactiver la signalisation QS, AttM codée par le gène *attM* présent sur le plasmide At, et AiiB dont le déterminant *aiiB* se trouve sur le plasmide Ti (Zhang *et al.*, 2002 ; Carlier *et al.*, 2003). L'expression d'AttM est induite par l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), et par la  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) et ses métabolites : le  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) et le semi-aldéhyde succinique (SSA). L'expression d'AiiB est induite, elle, par les agrocinopines A et B. La signalisation QS d'*Agrobacterium* implique donc fortement la plante hôte qui contribue à la régulation de la synthèse et de la dégradation des signaux NAHL. L'impact des lactonases dans le transfert du plasmide Ti a été évalué : il semble que les deux lactonases exercent un effet faible et transitoire sur la conjugaison du plasmide Ti de la bactérie donatrice, dégradatrice ou non des signaux NAHL, vers une bactérie réceptrice dépourvue de lactonase (Khan et Farrand, 2009 ; Haudecoeur *et al.*, 2009).

Dans ce chapitre, nous proposons d'évaluer le rôle des lactonases dans la modulation du niveau des signaux NAHL partagés entre bactéries, et par conséquent sur le transfert du



**Table 1. Bacterial strains and plasmids**

Strains	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<b>Bacteria</b>		
<i>E. coli</i> DH5α	supE44ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) hsdR17 deoR recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> CFBP 6276 <i>expI-</i> (6276-EI)	Potato soft rot pathogen, NAHL producer <i>expI</i> mutant derivative of CFBP 6276 strain	Smadja <i>et al.</i> , 2004 Latour <i>et al.</i> , 2007
<i>Erwinia carotovora</i> EC153 <i>ahII-</i> (AC511)	Plant pathogen, NAHL producer <i>ahI</i> mutant derivative of EC153 strain	Chatterjee <i>et al.</i> , 1979 Chatterjee <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrobacterium</i> sp		
A1	Isolate from tobacco rhizosphere, Genomic group G3	Laboratory collection
A2	Isolate from tobacco rhizosphere, Genomic group G1	Laboratory collection
A3	Isolate from tobacco rhizosphere, Genomic group G1	Laboratory collection
<i>A. tumefaciens</i> C58 derivatives		
C58	Wild-type, containing Ti and At plasmids, producing OC8HSL	Laboratory collection
C58-00	C58 derivative, free of Ti and At plasmids, Rif <sup>R</sup> and Sm <sup>R</sup>	Laboratory collection
C58- <i>aiiB</i>	C58 derivative, <i>aiiB</i> :: <i>acc1</i> , Gm <sup>R</sup>	Haudecoeur <i>et al.</i> , 2009
C58-Gm	C58 derivative, <i>atu6148</i> :: <i>acc1</i> , Gm <sup>R</sup>	Haudecoeur <i>et al.</i> , 2009
C58- <i>traI</i>	C58 derivative, <i>traI</i> :: <i>acc1</i> , Gm <sup>R</sup>	Haudecoeur <i>et al.</i> , 2009
C58- <i>accR</i>	C58 derivative, <i>accR</i> :: <i>acc1</i> , Gm <sup>R</sup>	Haudecoeur <i>et al.</i> , 2009
cheater 1	pTiC58Δ <i>accR</i> Δ <i>traI</i> nonpolar <i>traI</i> deletion mutant of pTiC58Δ <i>accR</i> ; transfer constitutive	Su <i>et al.</i> , 2008
cheater 2	cheater 1 derivative harboring pME <i>traM</i> ; transfer constitutive	This study
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTLR4		
	NT1 derivative of strain C58, carrying pZLR4, OC8HSL biosensor, Gm <sup>R</sup>	Cha <i>et al.</i> , 1998 Piper <i>et al.</i> , 1993
<i>Chromobacterium violaceum</i> CVO26		
	Double mini Tn5 mutant derived from strain ATCC 31532, C6HSL biosensor, Km <sup>R</sup>	McClellan <i>et al.</i> , 1997
<b>Plasmids</b>		
pME6000	A broad host-range vector, low copy number, Tc <sup>R</sup>	Maurhofer <i>et al.</i> , 1998
pME6010	A broad host-range vector, low copy number, Tc <sup>R</sup>	Heeb <i>et al.</i> , 2000
pME <i>aiiB</i>	pME6010 expressing <i>aiiB</i>	Carlier <i>et al.</i> , 2003
pME <i>traM</i>	pME6000 expressing <i>traM</i>	This study
pZLR4	<i>traG</i> :: <i>lacZ</i> / <i>traR</i> reporter system	Cha <i>et al.</i> , 1998

<sup>a</sup> Gm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup> indicate resistance to gentamycin, kanamycin, and tetracycline, respectively. NAHL., N-acylhomoserine lactones. OC8HSL ; 3-oxo-octanoylhomoserine lactone ; C6HSL, hexanoylhomoserine lactone. CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes.

plasmide Ti. Pour cela, nous utiliserons des bactéries productrices de signaux NAHL et d'autres qui sont incapables de produire les NAHL mais aptes à utiliser celles émises par les premières. Ces dernières seront appelées tricheurs ou parasites, car elles utilisent pour transmettre leurs propres plasmides Ti les signaux NAHL produits par une autre bactérie. Dans ce chapitre, les premières expériences décrites indiquent qu'il y a une possibilité pour des tricheurs d'exploiter les signaux QS produits par d'autres *Agrobacterium* ou par d'autres bactéries comme *Pectobacterium*, afin de transférer son propre plasmide Ti. Dans un second temps, les conséquences de l'expression de la NAHL-lactonase AiiB par une bactérie productrice de NAHL ou réceptrice du plasmide Ti sur le transfert de plasmide Ti d'un tricheur ont été évaluées. La lactonase AiiB est exprimée constitutivement ou induite en présence d'agrocinopines de synthèse. Enfin, l'effet de la dégradation des NAHL par les plantes (exprimant un gène bactérien codant la lactonase AttM) sur l'utilisation des signaux QS par un tricheur a été évalué dans les compartiments rhizosphère et tumeur.

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Conditions de culture

Les souches d'*A. tumefaciens* ont été cultivées sous agitation à 28°C en milieu Luria-Bertani modifié (LBm) dont la concentration en NaCl est portée à 5 g/L au lieu de 10 g/L. Durant les essais de conjugaison, *Agrobacterium* a été cultivée à 24°C en milieu *Agrobacterium* Broth minimal (AB, Chilton *et al.*, 1974) supplémenté en mannitol (0.2%) comme source de carbone, et en NH<sub>4</sub>Cl (1 g/L) comme source d'azote. *Escherichia coli* est cultivée à 37°C en milieu LBm, et *Pectobacterium* à 24°C. Les milieux ont été solidifiés en présence d'agar à 15 g/L. Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes: gentamycine, 20 mg/L; kanamycine, 50 mg/L; rifampicine, 100 mg/L et tétracycline, 10 mg/L.

### 2.2 Souches bactériennes et plasmides

Les souches utilisées sont décrites dans le tableau 1. Les dérivés d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 utilisées comme donatrices dans les essais de conjugaison possèdent un gène de résistance à un antibiotique sur leur plasmide Ti. La souche réceptrice C58.00 Rif<sup>R</sup> dépourvue de plasmide code une résistance chromosomique à la rifampicine.

La souche tricheur Ch1 a été fournie par le Dr. S.K. Farrand (Su *et al.*, 2008) ; ce mutant conjugue en absence d'opines, et possède une seconde mutation non-polaire dans le gène *trai* qui la rend incapable de produire l'OC8HSL. En revanche elle possède un système



de perception TraR fonctionnel permettant d'induire la conjugaison en présence d'OC8HSL. Pour construire la souche tricheur Ch2, le fragment d'ADN contenant le gène *traM* a été amplifié au moyen des oligos traM5 (5'-CGATTCATCTCGGATTCTAAC) et traM6 (5'-CAGTCGTTATCAAAGAGACCG). Après purification, le produit PCR a été cloné dans le vecteur pGEM-T easy, puis sous-cloné via les sites de restriction *EcoRI* dans le vecteur à large spectre pME6000 (Maurhofer *et al.*, 1998). Le plasmide obtenu pMEtraM a été introduit par électroporation dans le tricheur Ch1, et les transformants ont été sélectionnés par leur résistance à la Tc.

### 2.3 Obtention des opines et des extraits de tumeur

Les tumeurs induites par *A. tumefaciens* C58 ont été récoltées 5 semaines après infection. Cinq grammes de tumeur ont été incubés dans 10 ml d'eau stérile pendant 10 minutes à température d'ébullition, puis broyés au mortier. Deux mL de broyat ont été centrifugés 10 minutes à 14 g. Le surnageant récupéré constituait les extraits bruts de tumeurs utilisés pour l'induction naturelle de la production et de la dégradation des signaux QS mais aussi pour l'activation du mécanisme de conjugaison du plasmide Ti des bactéries productrices de NAHL. L'agrocinopine A de synthèse (Lindberg et Norberg, 1988) a été généreusement offerte par le Dr. T. Norberg (Organic Synthesis Department, Lund, Sweden).

### 2.4 Transfert conjugatif du plasmide Ti

#### 2.4.1 Conjugaison *in vitro*

Les expériences de conjugaison *in vitro* ont été réalisées en microplaques 96 puits. Le volume réactionnel était de 250  $\mu$ L en milieu ABm. Après une nuit d'incubation, les densités des précultures bactériennes ont été ajustées à une  $DO_{600nm}$  de 1,5. Cinq  $\mu$ L des ces précultures ont été introduits dans le milieu de culture en présence ou non d'OC8HSL exogènes, à la concentration de 2 ou 10 nM. Les deux tricheurs ont été ajoutés au milieu de culture, soit au début de l'expérience comme les autres souches, soit 48h après. Les cultures ont alors été incubées à 24°C. Vingt quatre h après introduction des tricheurs, les populations donatrices, réceptrices, tricheurs et les transconjugants nouvellement apparus ont été dénombrées. Pour cela, 5  $\mu$ L de différentes suspensions de dilution (NaCl 0.8%) du milieu de culture ont été déposés sur milieu LBm supplémenté avec les antibiotiques appropriés. Chaque expérience a été réalisée deux fois et comportait quatre réplicats.



#### 2.4.2 Conjugaison dans la rhizosphère de végétaux

Dans une première expérience, il s'est agi d'utiliser le milieu de culture (rhizosphère) de tabacs exprimant ou non la lactonase AttM cultivées en présence de signaux OC8HSL. Les plants de 2 lignées (n=12 transgéniques et 12 témoins) ont été incubés dans 1 ml de MS/2 supplémenté par 400 nM d'OC8HSL pendant 48 h. Les milieux de culture ont ensuite été regroupés par 4 et 5 µL des mélanges de surnageants ont été déposés sur plaque TLC pour évaluer le niveau d'OC8HSL essentiellement comme indiqué par ci-dessous. Les expériences de conjugaison ont été réalisées de la même manière que décrite plus haut. La différence portait sur l'ajout des surnageants de culture de tabacs après dilution au 1/50 ou 1/100.

Dans une seconde expérience, il s'est agi d'introduire directement dans la rhizosphère des plantules cultivées *in vitro* des bactéries donatrices et réceptrices. Les expériences *in vitro* en présence de plantules de tabacs exprimant ou non AttM ont été réalisées dans des plaques 24 puits. Le volume réactionnel était de 1ml de milieu MS/2. Les densités bactériennes étaient identiques à celles utilisées dans l'expérience menée sans plantes. Vingt µL de chaque souche ont été inoculés dans le volume réactionnel final de 1 mL. Les tricheurs ont été introduits 48h après le début de l'expérience. Le dénombrement des différentes populations bactériennes s'est fait de la même manière que précédemment, 24 h après introduction des tricheurs.

#### 2.4.3 Conjugaison *in planta*

Les souches bactériennes (tricheurs, réceptrice et productrice) ont été cultivées séparément une nuit dans 1 ml de milieu MG/L puis les DO<sub>600nm</sub> ont été ajustées à 1,5. Une incision de 4 cm de longueur a été réalisée au scalpel sur chaque tige. Dix µL d'un mélange des différentes souches (ratio 1 :1 :1) ont été inoculés au niveau de la blessure. Après 3, 5 et 7 semaines post-inoculation des plants de tabac, 3 tumeurs par condition ont été broyées, diluées dans du NaCl 0,8%, puis 5 µL des suspensions cellulaires ont été étalés sur milieux sélectifs pour dénombrer les bactéries donatrices (Gm<sup>R</sup> ou Km<sup>R</sup>), réceptrices (recipient, Rif<sup>R</sup>) et les transconjugants (Rif<sup>R</sup>Gm<sup>R</sup> ou Rif<sup>R</sup>Km<sup>R</sup>). Après deux jours de culture, des comptages ont été réalisés. (Seul le temps 7 semaines est montré pour les essais sur tabacs).

#### 2.5 Mesure des niveaux de NAHL

Deux bioindicateurs ont été utilisés afin de mesurer les niveaux de signaux QS dans les milieux de culture. *Chromobacterium violaceum* CVO26 produit le pigment violet violacéine proportionnellement, dans une certaine gamme de concentrations à la quantité de C6HSL présente (McClellan *et al.*, 1997), tandis qu'*Agrobacterium tumefaciens* NTLR4 possède un



système rapporteur *lacZ* dont l'activité  $\beta$ -galactosidase est induite par l'OC8HSL (Cha *et al.*, 1998). La quantité de C6HSL dans les échantillons a été révélée en déposant, sur plaque de chromatographie en couche mince (plaque TLC Réf. 4801-800, Whatman<sup>®</sup>), 10 $\mu$ L de chaque prélèvement et en appliquant une surcouche de bioindicateur *C. violaceum* CV026. Une gamme étalon de C6HSL servait de référence. La plaque a été incubée une nuit à 30°C. Le diamètre de chaque halo, comparé à ceux de la gamme étalon, a permis une estimation semi quantitative des concentrations. Une courbe de correspondance diamètre - concentration de C6HSL a été ainsi établie. La quantité d'OC8HSL est déterminée pour des volumes de 5 $\mu$ L déposés sur plaque TLC, par la visualisation de l'activité  $\beta$ -galactosidase d'*A. tumefaciens* NTLR4. Comme précédemment, le diamètre de chaque halo a été mesuré puis comparé à ceux de la gamme étalon.

## 2.6 Conditions de culture des plantes

Deux lignées de tabacs (*Nicotianum tabacum* cv. Samson) ont été utilisées pour étudier l'impact d'une plante capable de dégrader les signaux QS sur le niveau de ces signaux et sur le transfert horizontal du plasmide Ti. Une des deux lignées exprime la lactonase AttM d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 sous promoteur 35S du CaMV (D'Angelo-Picard *et al.*, 2011), l'autre provenant de la régénération d'un cal dans lequel les cellules végétales n'ont pas été transformées par le gène *attM*.

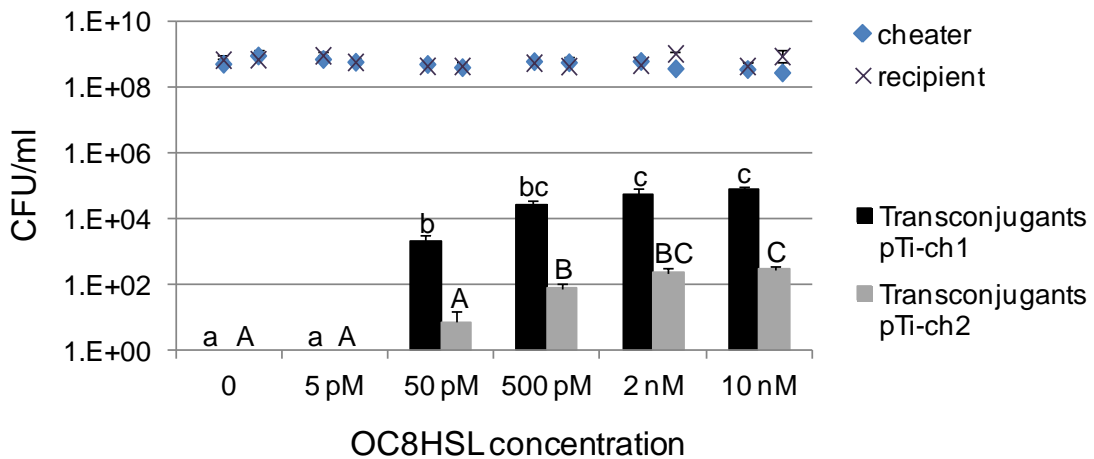
### 2.6.1 *In vitro*

Les graines de tabac ont tout d'abord été désinfectées par trois passages successifs dans de l'eau de Javel et rincées par de l'eau ultrapure stérile. Les graines ont ensuite été placées dans de l'éthanol à 70% et mises à sécher sur papier Whatman en conditions stériles. Les graines ont été mises à germer sur milieu Murashige et Skoog MS/2 (Sigma-Aldrich France, ref. M5519) tamponné à pH 5.6 par addition de 5M de NaOH et supplémenté en Vitamines de Morel et en sucrose 10% sur boîtes de Pétri carrées puis placées à 24°C en chambre de culture (16h de lumière, 8h d'obscurité) pendant deux semaines. Les plantules ont ensuite été transférées en pots stériles pour favoriser le développement des racines.

### 2.6.2 En serre

Les graines de plants de tabac ont été mises à germer en terrine puis les jeunes plants ont été transférés dans des pots individuels. Le substrat utilisé était du terreau et les plantes





**Figure 1: OC8HSL-dependent transfer of the plasmid Ti from the cheater-1 and -2 to the recipient strain C58.00.**

Bacterial cheater-1 (or cheater-2) harboring the plasmid pTi-ch1 (or pTi-ch2) and the recipient strain C58.00 were mixed at 1:1 ratio and incubated at 24°C in the presence of different concentrations of OC8HSL. After 24 h, cheaters, recipients and tranconjugants harboring pTi-ch1 (or pTi-ch2) were numbered on media supplemented with appropriate antibiotics. Measurements were performed in quadruplicate, and the experiment was repeated once. Statistically different values (Kruskall & Wallis,  $\alpha=0.05$  and ncompar) are noted by different letters.

ont été arrosées automatiquement deux fois par jour. Les plantes ont été soumises à 16h de lumière par jour et à une température de 24°C le jour et 17°C la nuit.

### 2.6.3 Test de l'activité NAHL-lactonase des plants de tabac transgénique

L'activité de dégradation des signaux QS a été évaluée pour chaque plant de tabac avant son utilisation lors des tests de conjugaison. Un disque foliaire de 1,6 cm de diamètre a été découpé (pour les tabacs cultivés en serre) et des jeunes plantules d'environ 2 mois (pour les tabacs *in vitro*) ont été placées dans 1ml de milieu MS/2 supplémenté de 25µM de C6HSL puis incubés à 24°C. Après 24 et 48h, le niveau de C6HSL a été mesuré dans le surnageant à l'aide du bioindicateur CVO26. Seuls les plants de tabac exprimant AttM ayant dégradé complètement la C6HSL ont été sélectionnés pour les expériences de conjugaison. Réciproquement, seuls les tabacs témoins n'ayant pas dégradé la C6HSL ont été conservés pour le reste de l'expérience.

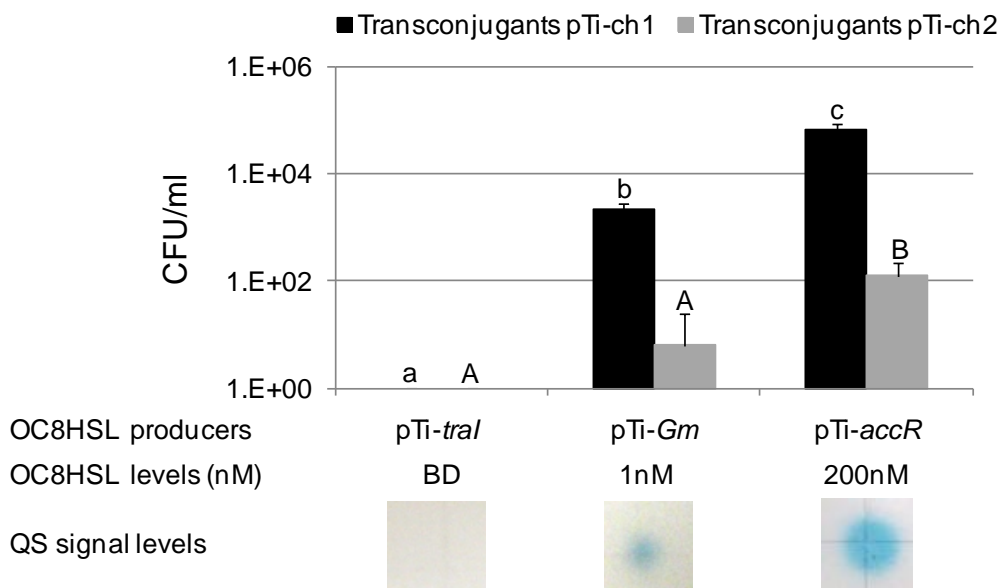
## 3 Résultats

### 3.1 Sensibilité et efficacité de conjugaison des tricheurs bactériens Ch1 et Ch2

Dans cette première partie, les objectifs étaient de tester la capacité des tricheurs Ch1 et Ch2 à transférer leur plasmide pTi-Ch1 et pTi-Ch2 en réponse à l'apport exogène d'OC8HSL pure, et en présence de bactéries produisant des signaux NAHL comme la bactérie modèle *A. tumefaciens* C58 et ses mutants *traI* et *accR*, ou des isolats non pathogènes d'*Agrobacterium*, ou des phytopathogènes du genre *Pectobacterium*.

#### 3.1.1 Les tricheurs répondent à l'OC8HSL

La capacité des deux tricheurs à utiliser l'OC8HSL pour transférer le plasmide Ti a été évaluée en milieu ABm. Les populations de tricheur et de réceptrice C58.00 ont été incubées à ratio 1:1 pendant 24 h en présence de différentes concentrations d'OC8HSL, puis les populations de bactéries donatrices et réceptrices et des transconjugants ont été dénombrées. Les populations des donatrices et réceptrices de l'ordre de 10<sup>8</sup> UFC/ml sont homogènes quelques soient les conditions testées (Fig. 1). Les transconjugants sont détectés à partir d'une concentration en OC8HSL minimale de 50 pM, et le nombre de transconjugants est plus élevé quand la concentration en OC8HSL est plus forte. Cependant, au-delà de 500 pM et 2 nM en présence du tricheur Ch1 et Ch2 respectivement, le nombre de transconjugants apparus n'augmente plus. Un plateau de saturation de la réponse est visible, suggérant qu'il existe une concentration d'OC8HSL pour laquelle il n'y a plus d'effet dose-réponse, niveau de NAHL-



**Figure 2: Cheaters may use the OC8HSL produced by *A. tumefaciens* C58 derivatives to promote transfer of their own plasmid Ti into the recipient strain C58.00.**

Bacterial cheater-1 (or cheater-2) harboring the plasmid pTi-ch1 (or pTi-ch2), recipient strain C58.00, and *A. tumefaciens* C58 derivatives harboring pTi-*Gm* (producing basal level of OC8HSL), pTi-*accR* (producing a high level of OC8HSL) or pTi-*tral* (defective for OC8HSL production) were mixed at 1:1:1 ratio and incubated at 24°C. After 24 h, cheaters, recipients, OC8HSL-producers and tranconjugants harboring pTi-ch1 (or pTi-ch2) were numbered on media supplemented with appropriate antibiotics, and level of OC8HSL was measured with the appropriate bioindicator. Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Kruskall & Wallis,  $\alpha=0.05$  and ncompar) are noted by different letters.

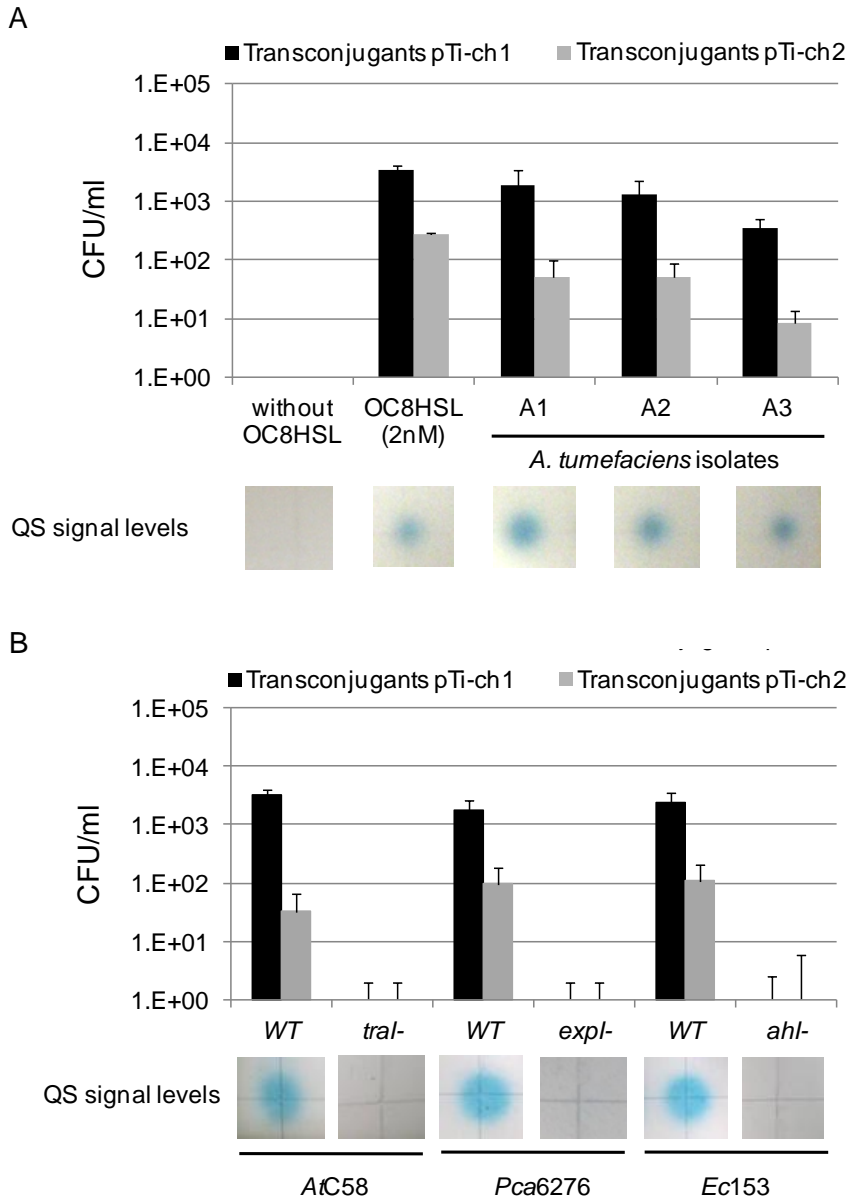
conjugaison. Cette expérience montre aussi que les deux tricheurs présentent des niveaux de réponse différents à l'OC8HSL. En effet, le nombre de transconjugants apparus pour une même concentration d'OC8HSL est environ 100 fois plus élevé quand la bactérie donatrice utilisée est le tricheur Ch1. Le modulateur TraM exprimé constitutivement dans le tricheur Ch2 affecte fortement l'efficacité de transfert du plasmide Ti du tricheur Ch2.

Les tricheurs Ch1 et Ch2 peuvent utiliser l'OC8HSL présente dans le milieu extracellulaire ; ils présentent des niveaux de réponse différents à l'OC8HSL se mesurant par l'apparition d'un nombre plus faible de transconjugants quand le tricheur Ch2 est utilisé comme donneur de plasmide Ti.

### 3.1.2 Les tricheurs sont capables d'utiliser les signaux QS produits par des bactéries

Dans ces expériences, l'apport de NAHL pure a été remplacé par l'apport de bactéries produisant des signaux NAHL. Les signaux NAHL doivent alors diffuser hors des bactéries productrices dans le milieu extracellulaire puis rentrer dans les cellules des tricheurs afin d'induire le mécanisme de conjugaison. Ces expériences sont réalisées en présence de 3 partenaires bactériens : une souche produisant des signaux NAHL, une souche réceptrice C58.00, et les tricheurs Ch1 ou Ch2.

Tout d'abord, des dérivés d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 mutés sur le plasmide pTi et produisant des niveaux d'OC8HSL différents ont été utilisés : la souche C58(pTi-*Gm*) est marquée d'un gène de résistance à la Gm sur le plasmide Ti et produit un niveau d'OC8HSL équivalent à celui de la souche sauvage C58 ; le mutant *traI* est déficient pour la synthèse d'OC8HSL (pTi-*traI*) ; le mutant *accR* est un surproducteur de signaux OC8HSL car muté pour le répresseur AccR qui contrôle l'expression de l'opéron *tra* (pTi-*accR*). Les trois mutants qui sont tous Gm<sup>R</sup> ont été inoculés alternativement au même moment que les souches réceptrices (Rif<sup>R</sup>) et les tricheurs Ch1 ou Ch2 (Km<sup>R</sup>). Parallèlement au dénombrement des transconjugants après 24 h d'incubation, les niveaux d'OC8HSL ont été mesurés en utilisant la souche bioindicatrice *Agrobacterium* NT1(pZLR4). Aucun signal QS n'est détecté en présence de *traI* et aucun transconjugant n'est observé (Fig. 2). Le mutant *Gm* produit un niveau basal d'OC8HSL de l'ordre de 1 à 2 nM et le nombre de transconjugants des plasmides tricheurs est significativement plus faible qu'en présence du mutant *accR* qui produit environ 200nM d'OC8HSL. Ici encore, le nombre de transconjugants est le plus élevé en présence du tricheur Ch1 qu'en présence du tricheur Ch2.



**Figure 3: Cheaters may use the NAHLs produced by *Agrobacterium* and *Pectobacterium* isolates to promote transfer of their own plasmid Ti into the recipient strain C58.00.**

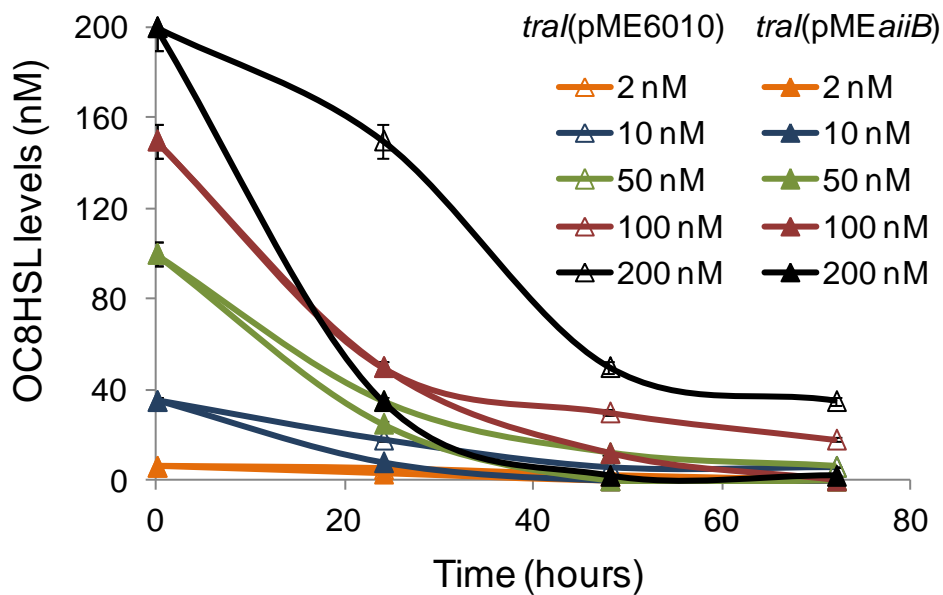
Three-partner experiments were performed as described in Fig. 2, using the following NAHL-producers, (A) three avirulent, pTi-defective *Agrobacterium* isolates A1, A2 and A3 belonging to G1 and G3 genomic groups and (B) *Pectobacterium atrosepticum* CFBP6276 and *Pectobacterium carotovorum* 153, as well as their NAHL-defective derivatives *expl* and *ahlI*, respectively. After 24 h, transconjugants and levels of NAHLs were measured. Measurements were performed in quadruplicate and the experiments were repeated once.

Selon un protocole expérimental similaire, l'induction du transfert des pTi des tricheurs a ensuite été étudiée en présence de trois souches d'*Agrobacterium* isolées au laboratoire à partir d'une rhizosphère de tabac. Ces isolats dépourvus du plasmide Ti et non pathogènes sur plants de tomate ne produisent pas de l'OC8HSL mais probablement un signal NAHL de type hydroxy-C8HSL. Contrairement à *A. tumefaciens* C58 qui appartient à l'espèce génomique G8, ces isolats sont associés (sur la base de la séquence du gène *recA*) aux espèces génomiques G1 et G3. Après 24 h de contact entre productrices de NAHL, tricheurs et réceptrices, l'apparition de transconjugants a été corrélée à une production de NAHL (Fig. 3A). Enfin, dans une autre expérience, le transfert des pTi-Ch a été mesuré en présence de souches Pca6276 et Ec153 productrices d'OC8HSL qui appartiennent au genre bactérien *Pectobacterium* dont la virulence est régulée par QS. En présence de ces deux souches, l'efficacité de transfert du plasmide Ti des tricheurs est semblable à celle en présence d'*A. tumefaciens* C58 (Fig. 3B). En revanche, aucun transconjugant n'est observé avec les mutants *expI* et *ahI* affectés pour la synthèse des signaux QS.

En résumé de cette première partie, les deux tricheurs sont capables d'utiliser l'OC8HSL, mais aussi d'autres signaux NAHL (hydro-C8HSL), produits par *A. tumefaciens* et *Pectobacterium* afin d'activer le transférer de leur plasmide Ti à une bactérie réceptrice. La mesure des niveaux de NAHL en parallèle du dénombrement des transconjugants ont permis de montrer un effet dose (NAHL)-réponse (nombre de transconjugants). Le niveau de transfert du plasmide d'un tricheur reflète donc la disponibilité des signaux NAHL dans le milieu extérieur. Cette efficacité de transfert du pTi est aussi liée à la sensibilité du système QS des tricheurs comme le montre les différences de réponse entre les deux tricheurs pour une même concentration de NAHL.

### 3.2 Effet de la dégradation des signaux QS sur la conjugaison des tricheurs

Dans cette deuxième partie, l'objectif était de déterminer les concentrations appropriées de signaux NAHL et le moment adéquat d'introduction des tricheurs pour mesurer l'impact de la dégradation des signaux QS sur le transfert du plasmide Ti des tricheurs. Pour cela, le plasmide pME6010 vide et son dérivé exprimant constitutivement la lactonase AiiB, le plasmide pME*a*iiB, ont été introduits dans le mutant *traI* d'*A. tumefaciens* C58 ne produisant pas d'OC8HSL. La souche *traI*(pME*a*iiB) a été utilisée comme une bactérie dégradant les NAHL et la souche *traI*(pME6010) comme souche témoin non-dégradatrice dans les expériences décrites ci-dessous.



**Figure 4: Lactonase AiiB-mediated degradation of OC8HSL in culture medium**

The *tral* mutant of *A. tumefaciens* C58 harboring the empty plasmid pME6010 or its derivative pME*aiiB* expressing the lactonase AiiB was incubated with different concentrations of OC8HSL. OC8HSL level was quantified at different times.

### 3.2.1 Cinétique de dégradation de l'OC8HSL par le mutant *traI*(pME*aaiB*)

L'activité de dégradation de *traI*(pME*aaiB*) versus celle de *traI*(pME6010) a été évaluée en présence de différentes concentrations d'OC8HSL (2, 10, 50, 100, et 200 nM). Après 48 h d'incubation (Fig. 4), l'OC8HSL n'est plus détectée en présence du mutant dégradateur *traI*(pME*aaiB*) pour des concentrations inférieures à 50 nM tandis que la concentration résiduelle d'OC8HSL quand *traI* exprime le pME6010 est de 2, 6 et 12 nM pour des concentrations initiales de 2, 10 et 50 nM respectivement. Les concentrations les plus faibles, correspondant aux niveaux produits par *AtC58* à savoir 2 et 10 nM d'OC8HSL permettent donc d'obtenir des niveaux d'OC8HSL différents au bout de 48 h selon que le mutant *traI* exprime ou pas la lactonase *AiiB*. Cette expérience a permis d'évaluer le temps nécessaire au mutant *traI*(pME*aaiB*) pour dégrader les signaux OCHSL apportés de manière exogène.

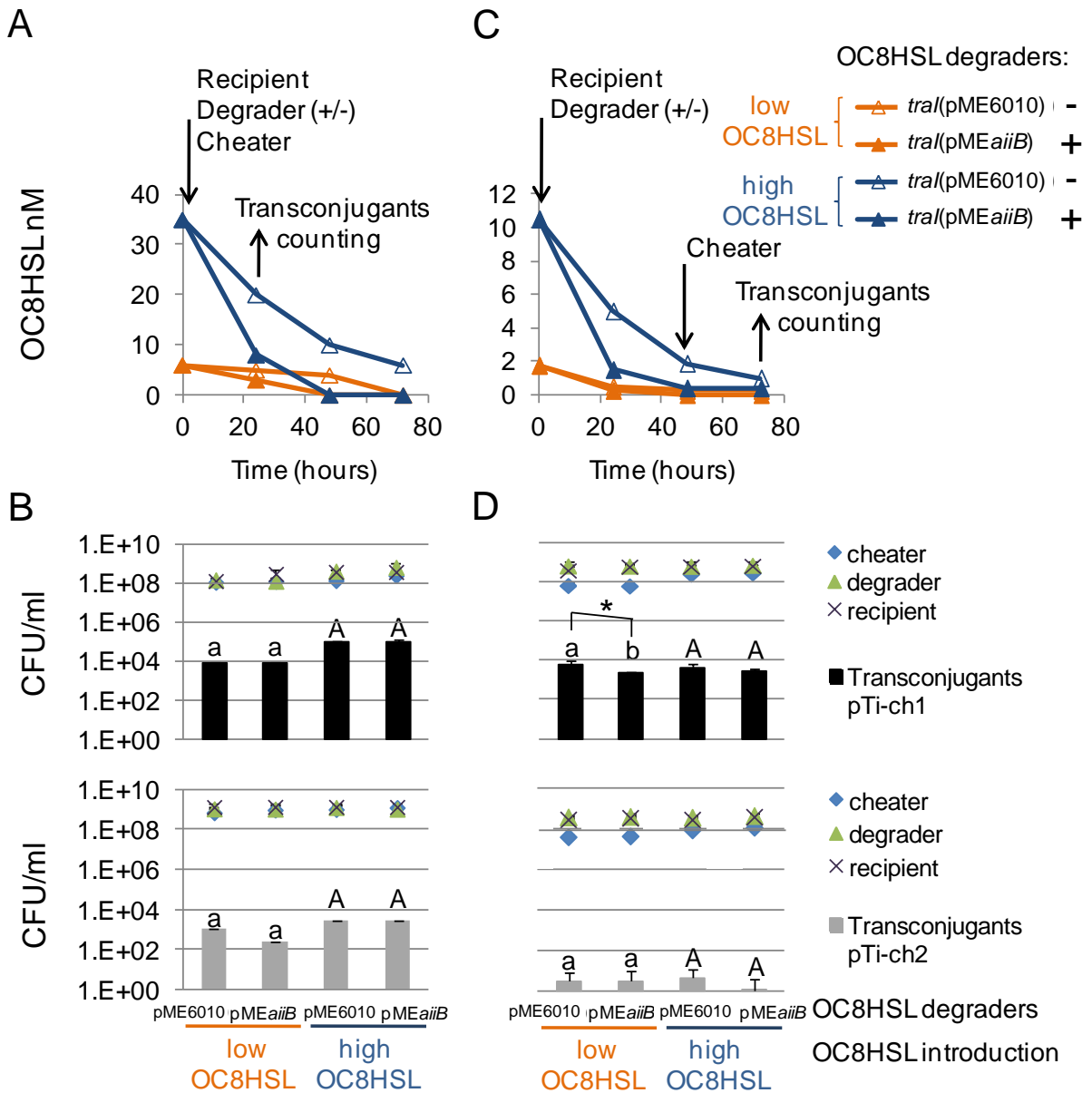
### 3.2.2 Importance du facteur temporel dans l'introduction des tricheurs pour étudier le rôle de la dégradation des signaux QS par la lactonase *AiiB*

Dans les expériences suivantes les concentrations de 2 nM (faible niveau) ou 10 nM (haut niveau) d'OC8HSL exogène ont été retenues pour comparer deux situations contrastées dans lesquelles les tricheurs sont inoculés soit au début de l'expérience et en même temps que les populations réceptrices et dégradant les signaux NAHL, soit 48 h après l'inoculation des populations réceptrices et dégradant les signaux NAHL. Ce décalage de 48 h a été choisi au regard de l'expérience précédente qui montre son importance dans la dégradation des NAHL par le mutant *traI*(pME*aaiB*).

Les niveaux de NAHL ont été mesurés aux différents temps de l'expérience (Fig.5A et C) et les différentes populations de transconjugants, tricheurs et réceptrices dénombrées 24 h après introduction des tricheurs (Fig. 5B et D). Lorsque les tricheurs Ch1 ou Ch2 sont introduits en même temps que les autres souches, aucune différence significative du nombre de transconjugants liée à la présence d'un dégradateur n'est observée et cela en présence de 2 nM ou 10 nM d'OC8HSL (Fig.5B). Cependant, quand l'introduction du tricheur Ch1 est décalée de 48 h et que la concentration d'OC8HSL initiale est de 2 nM, le nombre de transconjugants est significativement plus faible lorsque *traI* exprime la lactonase *AiiB*. Le transfert du pTi du tricheur Ch2 est très faible et n'est pas significativement différent quand la lactonase *AiiB* est exprimée ou pas (Fig. 5D).

L'expression de la lactonase *AiiB* dans le mutant *traI* peut affecter le transfert conjugatif du plasmide Ti d'un tricheur via la modification du niveau extracellulaire





**Figure 5: Lactonase AiiB-mediated degradation of OC8HSL affected transfer of plasmid Ti from cheater to recipient bacteria**

Three-partner conjugation assays were performed using the recipient C58.00, cheater-1 or -2, and *tral* mutant harboring pME*aiiB* (NAHL-degrader) or pME6010 (non-degrader) in the presence of a low or high level of OC8HSL. In A, the 3 bacterial populations were mixed at the same time, while in C, cheaters were added 48 h after the introduction of the recipient and *tral* derivatives in culture medium. In A and C, OC8HSL level was quantified at different times and black arrows indicate the introduction of the different populations (down arrow) and sampling for counting (up arrow). In B and D, all populations were counted 24 h after the introduction of the cheaters. Measurements were performed in quadruplicate and the experiments were repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

d'OC8HSL. Cependant, pour observer un effet de la dégradation des NAHL par la lactonase AiiB, l'introduction des tricheurs doit se faire de manière décalée par rapport à celle des souches dégradant les NAHL. D'un point de vue écologique, cela correspondrait à une situation d'invasion par des tricheurs. En revanche lorsque les tricheurs sont introduits au début de l'expérience, la disponibilité des NAHL exogènes est la même car la lactonase n'a pas encore produit son effet (Fig. 5A). Les expériences suivantes ont été réalisées en introduisant les tricheurs 48 h après inoculation de la réceptrice et des autres souches utilisées.

### 3.3 Association des fonctions de production et de dégradation des signaux QS dans une même bactérie : impact sur le niveau de NAHL exogènes et sur la réponse des tricheurs

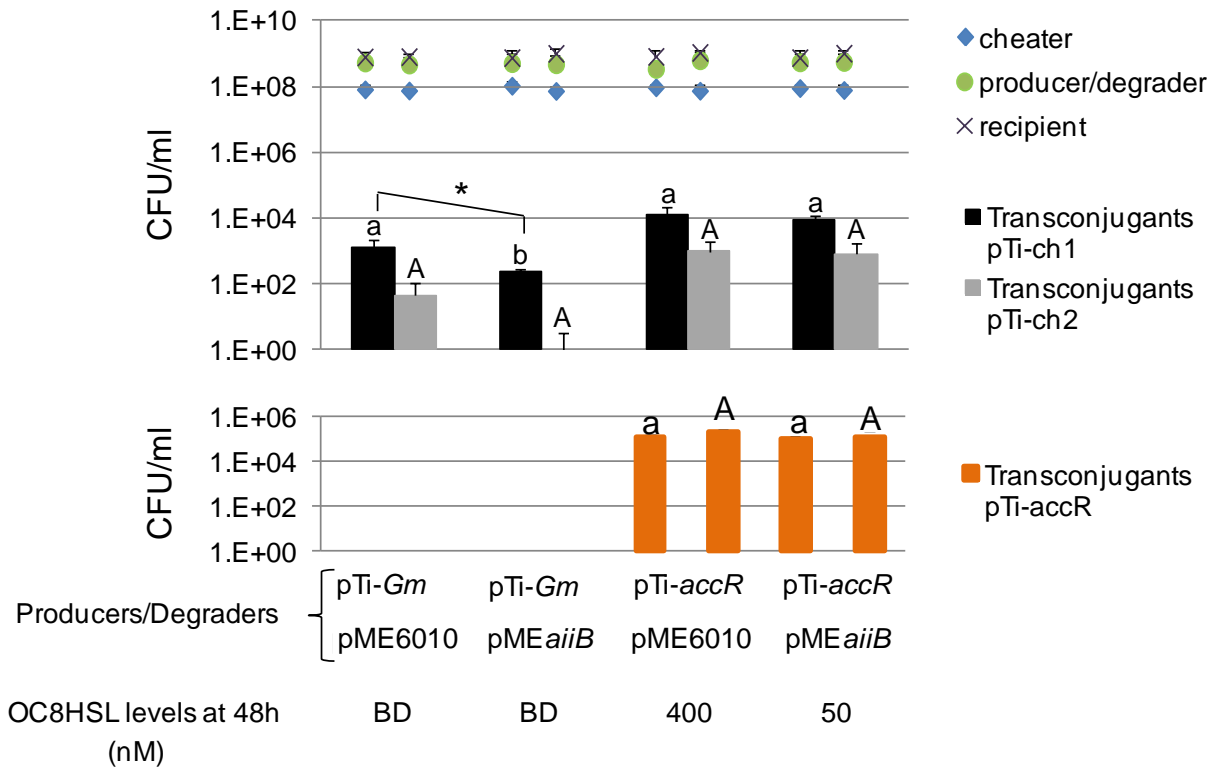
Dans cette partie, les fonctions de production et de dégradation des signaux NAHL sont réalisées par un même organisme. Dans ces conditions, le niveau extracellulaire d'OC8HSL est la résultante de la synthèse et de la dégradation de l'OC8HSL par la même bactérie. Dans ce contexte, qui est le plus proche de celui rencontré chez la souche *A. tumefaciens* C58, la capacité des tricheurs à parasiter la production de NAHL exogène a été évaluée.

Deux niveaux de production de signaux NAHL ont pu être comparés : celui de la souche C58(pTi-*Gm*) dont le niveau d'OC8HSL est équivalent à celui de la souche sauvage C58 en absence d'agrocinopine et celui du mutant *accR* qui est un surproducteur de signaux OC8HSL et qui reflète le niveau maximum attendu en présence d'agrocinopine. Afin d'être au plus près des conditions naturelles, l'agrocinopine A de synthèse a pu être utilisée pour induire la synthèse et la dégradation des signaux NAHL chez la souche *A. tumefaciens* C58.

#### 3.3.1 Expression constitutive de la lactonase AiiB dans les producteurs de NAHL

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée en absence d'opines conjugatives. Les plasmides pME6010 et pME*aiiB* ont été introduits dans les mutants dérivés d'*A. tumefaciens* C58 porteurs des pTi-*Gm* et pTi-*accR*. Les souches C58pTi-*Gm*(pME6010 ou pME*aiiB*) et C58pTi-*accR*(pME6010 ou pME*aiiB*) couplant production et/ou dégradation des signaux NAHL ainsi que la bactérie réceptrice C58.00 ont été co-cultivées pendant 48 h avant inoculation des tricheurs.

En présence du mutant C58pTi-*Gm*, les niveaux extracellulaires d'OC8HSL à l'introduction des tricheurs sont sous le seuil de détection du bioindicateur (Fig.6). Pourtant, le nombre de transconjugants portant le pTi du tricheur Ch1 est significativement plus faible



**Figure 6: Bacterial populations, in which production and degradation of OC8HSL were associated, were able to limit sexual cheating**

Three-partner conjugation assays were performed using the recipient C58.00, cheater-1 or 2, and *A. tumefaciens* C58 derivatives harboring pTi-*Gm* (producing a basal level of OC8HSL) or pTi-*accR* (producing a high level of OC8HSL), in which was introduced the plasmid pME6010 (non-degrader) or pME*aiiB* (NAHL-degrader). Invading cheaters were introduced 48 h after the recipient and producers, and all populations were counted 24 h later. Levels of OC8HSL were measured at the introduction of the cheater in the culture medium of the different conditions (BD, below detection). Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

lorsque le mutant C58pTi-*Gm* exprime AiiB (Fig. 6). En présence des mutants C58pTi-*accR* exprimant ou non AiiB, les niveaux d'OC8HSL sont de 50 nM et 400 nM, respectivement. Ces concentrations sont bien supérieures au seuil de saturation du système de perception des signaux NAHL par les tricheurs (voir Fig. 1), et aucune différence du nombre de transconjugants portant les pTi des tricheurs n'est observée (Fig. 6). Il est important de noter que l'expression de la lactonase AiiB n'a pas d'effet sur le transfert conjugatif de la souche C58pTi-*accR* produisant les signaux QS.

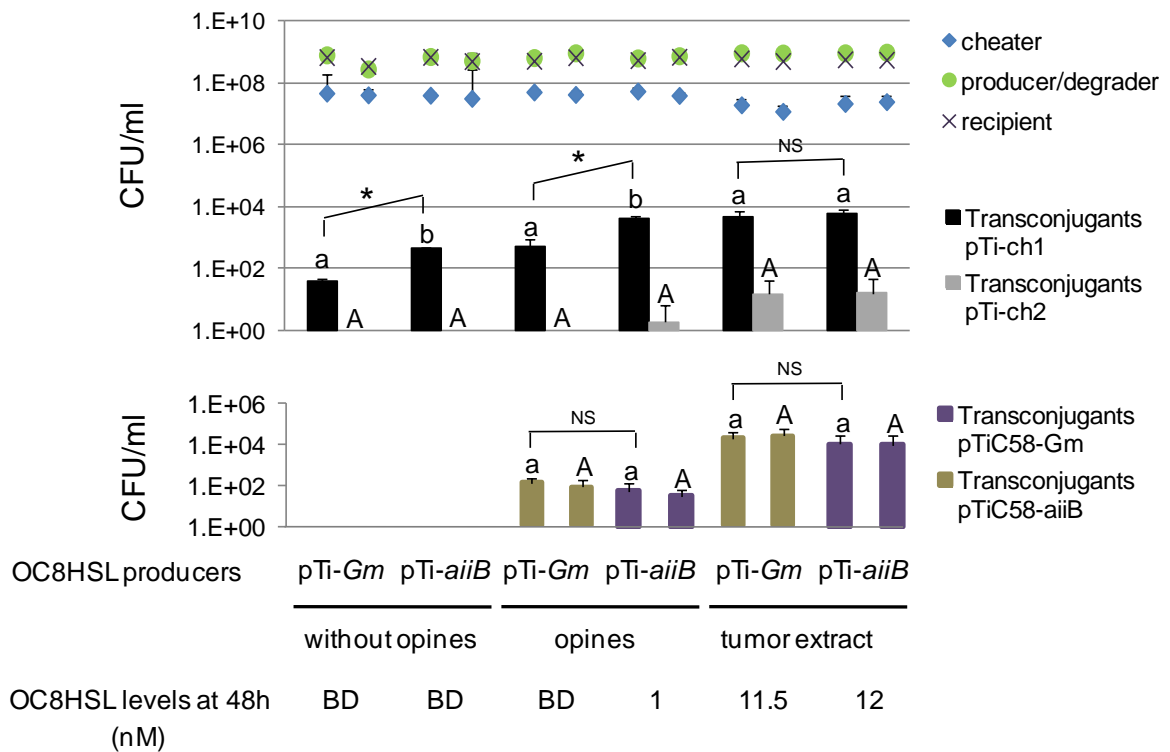
Ces expériences montrent que la lactonase AiiB exprimée dans la bactérie productrice d'OC8HSL peut affecter le transfert de plasmide Ti d'un tricheur. Cependant, cela n'est observé qu'en présence d'un niveau faible de signaux NAHL extracellulaire ( $\leq 2$  nM).

### 3.3.2 Induction de la production et la dégradation des NAHL par les agrocinopines

Dans cette expérience, la dégradation et la production des signaux QS a été induite par l'ajout d'agrocinopine A de synthèse ou d'extraits de tumeurs de tomates induites par *AtC58*, donc contenant l'agrocinopine A qui induit l'expression d'*aiiB* et de *traI* codant respectivement la dégradation et la synthèse des NAHL. Afin d'évaluer le rôle d'AiiB, nous avons comparé les mutants C58pTi-*Gm* et C58pTi-*aiiB*. Les réceptrices et les producteurs (mutants C58pTi-*Gm* et C58pTi-*aiiB*) sont incubés pendant 48 h avant l'introduction des tricheurs, puis les populations sont titrées 24 h après. Les populations de tricheurs, producteurs et réceptrices sont quant à elles relativement stables entre les différentes conditions. Les différences observées ne sont donc pas dues à une proportion inférieure d'une population spécifique dans une des conditions.

En absence d'opines ou d'extrait de tumeur, l'expression de *traI* et d'*aiiB* est à un niveau basal. Le niveau d'OC8HSL à ce moment est inférieur au seuil de détection ( $\leq 1$  nM). Dans ces conditions, le nombre de transconjugants mesuré possédant le pTi du tricheur Ch1 est significativement supérieur lorsque la lactonase AiiB n'est pas exprimée (Fig. 7). En revanche, les souches C58pTi-*Gm* et C58pTi-*aiiB* n'ont pas été capables de transférer leur propre plasmide Ti.

En présence d'agrocinopine de synthèse, les signaux NAHL sont détectés en présence du mutant pTi-*aiiB*, le tricheur Ch1 est affecté pour sa capacité à disséminer son propre plasmide, mais la lactonase n'affecte pas le transfert du plasmide Ti chez la souche



**Figure 7: Limitation of sexual cheating under natural induction of lactonase AiiB and synthesis of OC8HSL in the presence of agrocinopine.**

Three-partner conjugation assays were performed using the recipient C58.00, cheater (1 or 2), and *A. tumefaciens* C58 derivatives harboring pTi-Gm or pTi-*aiiB* (defective for the lactonase AiiB) in the presence of pure agrocinopine A (50 $\mu$ g/ml) or tumour extracts as natural inducers for OC8HSL synthesis and AiiB-mediated degradation of OC8HSL. Invading cheaters were introduced 48 h after the recipient and producers were mixed, and all populations, including transconjugants which received the Ti plasmid from cheaters (pTi-ch1 or pTi-ch2) or OC8HSL-producers (pTiC58-Gm or pTiC58-*aiiB*), were counted 24 h later. Level of OC8HSL was measured when cheaters were introduced. Data were collected from 8 replicates in two independent experiments. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

productrice de NAHL. Il existe donc un avantage à exprimer la lactonase pour atténuer la propagation du plasmide des tricheurs sans affecter celle du producteur.

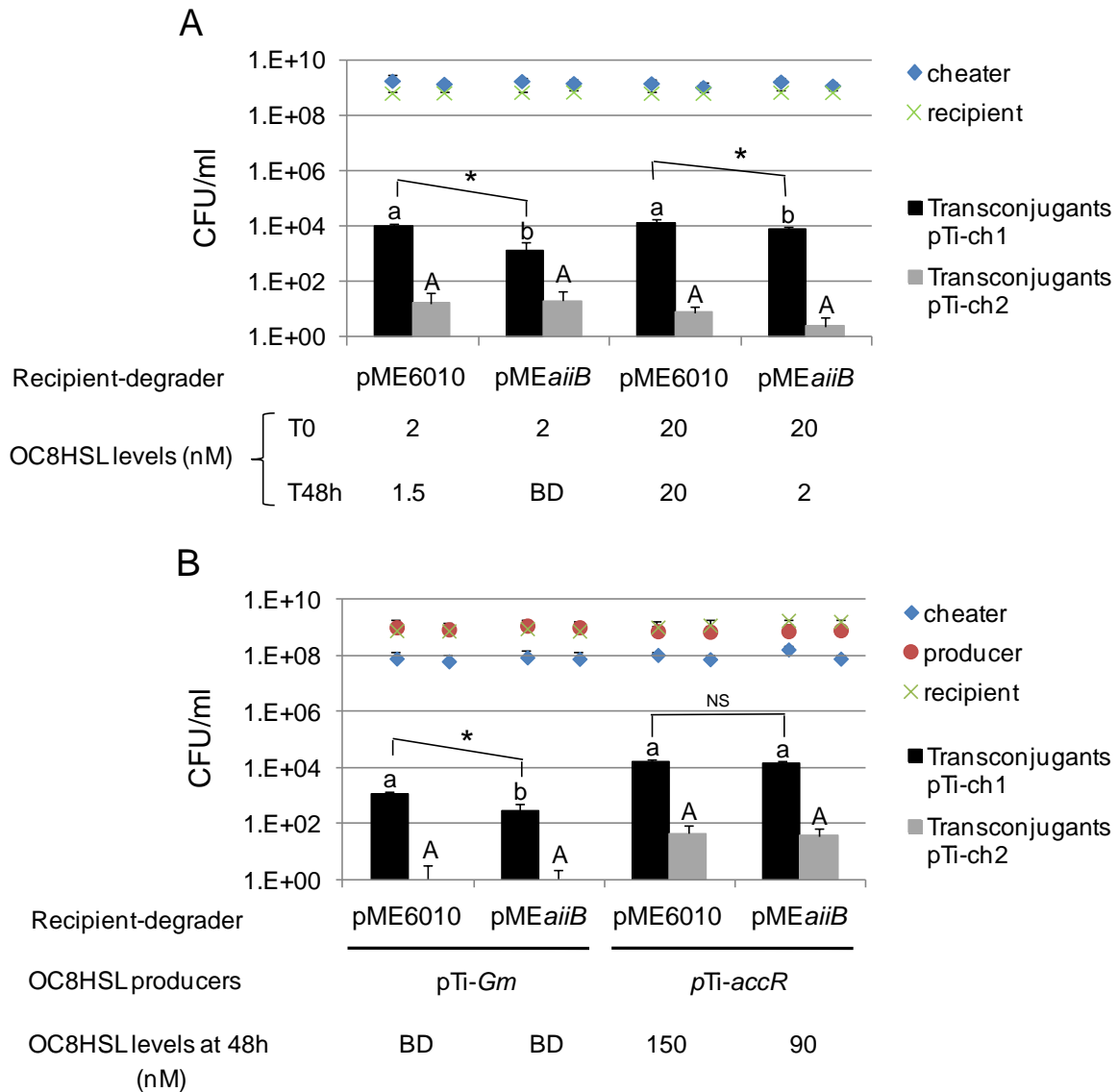
En présence d'extraits bruts de tumeurs, le niveau d'OC8HSL à 48 h est similaire (11.5 nM et 12 nM) quand le producteur exprime ou pas la lactonase AiiB, et les niveaux de transconjugants (pTi-Ch1 ; pTi-Ch2, pTi-*Gm*, pTi-*aaiB*) ne sont pas différents.

Cette expérience cruciale montre que la lactonase AiiB a un effet sur le transfert du plasmide Ti des tricheurs lorsque les fonctions de production et dégradation des NAHL sont présentes dans le même organisme mais pour des niveaux de NAHL faibles. De plus, aucun effet sur le propre transfert du plasmide Ti des producteurs/dégradeurs n'est observé dans ces conditions. D'un point de vue écologique, cette fenêtre d'efficacité de la lactonase AiiB correspondrait à la phase de début d'accumulation des opines dans la tumeur.

#### 3.4 Rôle de la fonction de dégradation des NAHL associée aux bactéries réceptrices sur le transfert conjugatif des tricheurs

Dans la rhizosphère, de nombreuses agrobactéries sont capables de dégrader les signaux QS, notamment à cause du gène *attM* (*blcC*) codé par le plasmide At. Cette partie a pour objectif d'évaluer l'impact de la dégradation d'une bactérie réceptrice sur le transfert du plasmide Ti d'un tricheur. Pour cela, les plasmides pME6010 et pME*aaiB* ont été électroporés dans la souche réceptrice C58.00.

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée par apport d'OC8HSL pure, donc en absence de bactéries productrices de NAHL. La souche réceptrice portant le plasmide pME6010 ou pME*aaiB* ont été cultivées pendant 48 h en présence de 2 nM ou 10 nM d'OC8HSL avant introduction des tricheurs. Les densités bactériennes des populations de tricheurs et réceptrices mesurées 24 h après introduction des tricheurs sont équivalentes dans les différentes conditions. Les niveaux d'OC8HSL à l'introduction des tricheurs montrent l'efficacité de l'expression d'AiiB chez C58.00 à abaisser la concentration extracellulaire d'OC8HSL (Fig. 8A). Le nombre de transconjugants dont le plasmide Ti provient du tricheur Ch1 est significativement plus faible lorsque la réceptrice C58.00 exprime la lactonase AiiB aux deux concentrations testées (Fig. 8A). Aucune différence n'est observée en présence du tricheur Ch2 et le nombre de transconjugants mesuré dans les différentes conditions est très faible.



**Figure 8: lactonase expressing recipient strain may affect sexual cheating**

In A, two-partner conjugation was performed with the recipient C58.00 harboring pME*aiiB* (OC8HSL-degrader) or pME6010 (non-degrader) and the cheater-1 or -2 in the presence of a low (2 nM) or high (20 nM) level of OC8HSL. Invading cheaters were introduced to the culture 48 hours after recipients. All populations were counted 24 hours after the introduction of cheaters; levels of OC8HSL were measured at the beginning of the experiment (T0) and when the cheaters were introduced (T48 h).

In B, three-partner conjugations were performed with the recipient C58.00 harboring pME*aiiB* or pME6010, the OC8HSL-producing strains harboring pTi-*Gm* (a basal level of OCHSL) or pTi-*accR* (a high level of OC8HSL), and the cheaters (1 or 2). OC8HSL was measured when the cheaters were introduced to the culture, then all populations were measured 24 h after cheater invasion. In A and B, measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

Dans un deuxième temps, l'OC8HSL synthétique a été remplacée par les mutants C58pTi-*Gm* et C58pTi-*accR*. Dans ces conditions, les niveaux d'OC8HSL mesurés à l'introduction du tricheur sont sous le seuil de détection du bioindicateur en présence du mutant C58pTi-*Gm*. Aucun transconjugant n'est dénombré quand le tricheur Ch2 est utilisé comme donneur de plasmide Ti. En revanche, le nombre de transconjugants dont le pTi provient du tricheur Ch1 est significativement inférieur lorsque le receveur C58.00 exprime la lactonase AiiB (Fig. 8B). Lorsque le mutant C58pTi-*accR* est utilisé comme producteur fort de NAHL, aucune différence du nombre de transconjugants portant les plasmides des tricheurs Ch1 et Ch2 n'est observée que le receveur exprime ou pas la lactonase AiiB.

La capacité de dégradation de la réceptrice C58.00 permet de limiter le transfert du plasmide Ti des tricheurs quand la concentration d'OC8HSL initiale est inférieure à 10 nM. La souche réceptrice contribue à limiter la propagation de plasmide déficient pour la synthèse des NAHL et incapable de se propager en absence de coopération avec des bactéries productrices.

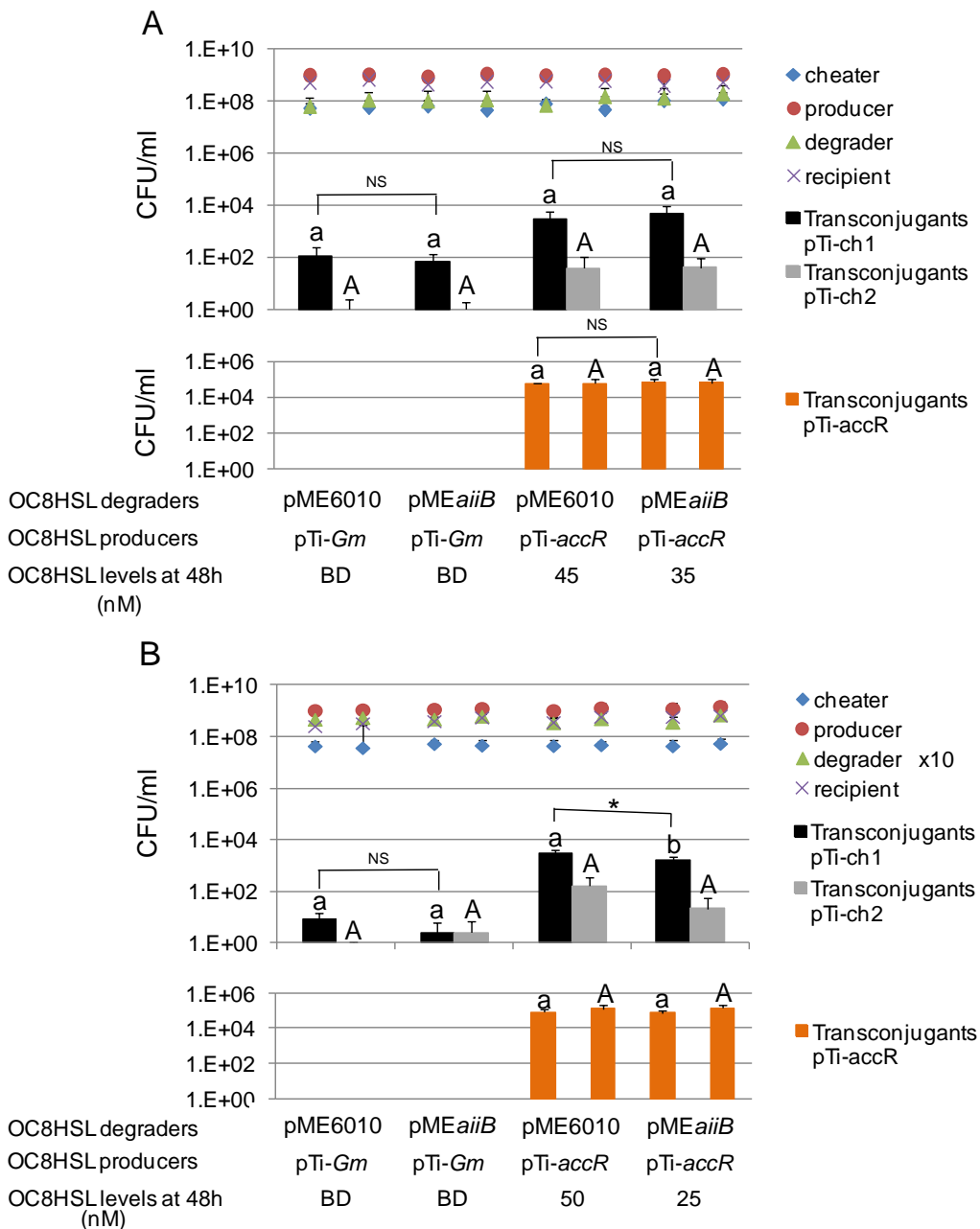
### 3.5 Dissociation des fonctions de dégradation et de production

La communication QS croisée peut entraîner des coopérations entre différentes bactéries. Dans cette partie, les fonctions de production et de dégradation sont donc séparées et portées par des organismes différents. Ainsi, les producteurs utilisés sont les mutants *Gm* et *accR* et les dégradateurs, *traI* (pME6010) et *traI* (pME*a*iiB). Ici encore, les tricheurs sont ajoutés 48 heures après les autres souches.

Aucune différence du nombre de transconjugants n'est observée dans les différentes conditions testées quand le mutant *traI* exprime AiiB ou pas (Fig. 9A). Le niveau d'OC8HSL mesuré en présence du mutant *Gm* est en dessous du seuil de détection du bioindicateur, et en présence d'*accR*, de 35 nM quand *traI* exprime AiiB et de 45 nM quand *traI* n'exprime pas AiiB. Le transfert du plasmide Ti du mutant *accR* a aussi été mesuré et aucun effet de la présence du mutant *traI* exprimant AiiB n'est observé.

Dans un deuxième temps, l'expérience précédente a été de nouveau réalisée mais la densité bactérienne de la population de dégradateurs a été multipliée par 10 afin de mesurer l'effet sur le transfert du plasmide Ti d'un tricheur d'un environnement dans lequel l'activité NAHLase des bactéries est forte (Fig. 9B). Le nombre de transconjugants en présence du mutant *Gm* est très faible et le niveau d'OC8HSL en dessous du seuil de détection du





### Figure 9: Impact of a degrader on cheating

A Transconjugants were measured 24 hours after introduction of the cheaters in presence of OC8HSL-producers C58-*Gm* or C58-*accR* and of OC8HSL-degrader, the *tral* mutant harboring the pME*aiiB* plasmid or the pME6010 used as control.

B OC8HSL-degraders were introduced at a 10 fold higher cell density than the other strains.

Transconjugants are expressed in CFU per milliliter of medium. Levels of OC8HSL were measured at the introduction of the cheater in the culture medium of the different conditions. Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

bioindicateur. Cependant, quand le mutant *accR* est utilisé comme producteur et en présence d'une forte population du mutant *traI* exprimant AiiB, le nombre de transconjugants provenant du tricheur Ch1 est significativement plus faible que lorsque *traI* n'exprime pas AiiB. Les niveaux d'OC8HSL mesurés sont de 25 nM et 50 nM quand *traI* exprime ou non AiiB respectivement (Fig. 9B). Le transfert du plasmide Ti du mutant *accR* a aussi été mesuré mais aucun effet de la présence du mutant *traI* exprimant AiiB n'est observé.

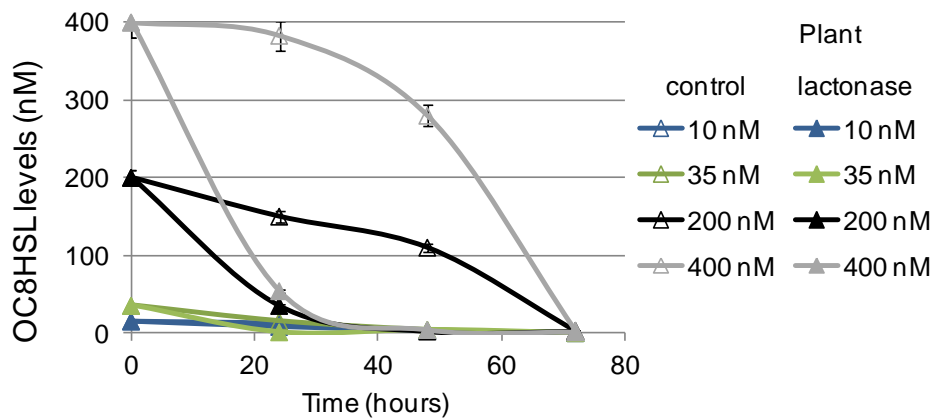
La présence d'une forte densité de bactéries dégradatrices des signaux QS peut donc perturber le transfert de plasmide Ti des tricheurs. Cependant, l'effet observé peut aussi s'expliquer par une diminution de la disponibilité des signaux due à la forte densité bactérienne dans le milieu de culture comme le montre le très faible nombre de transconjugants possédant le plasmide Ti du tricheur Ch1 en présence du mutant *Gm* et de *traI*(pME6010) à très forte densité comparé à la condition à densité équivalente.

### 3.6 Dégradation des signaux QS par des plantes

Il a été montré que certaines légumineuses ont la capacité de dégrader les signaux NAHL (Delalande *et al.*, 2005), suggérant que la communication bactérienne et le transfert de gènes régulé par QS peuvent être modifiés par les plantes. Dans cette partie, l'impact de plantes dégradant les NAHL sur le transfert de pTi de tricheurs a été évalué. Pour cela, des plants de tabac exprimant la lactonase AttM ont été utilisés. Une lignée de tabacs n'exprimant pas AttM a été utilisée comme témoin. Chaque plantule de tabac est testée au préalable pour la dégradation de la C6HSL.

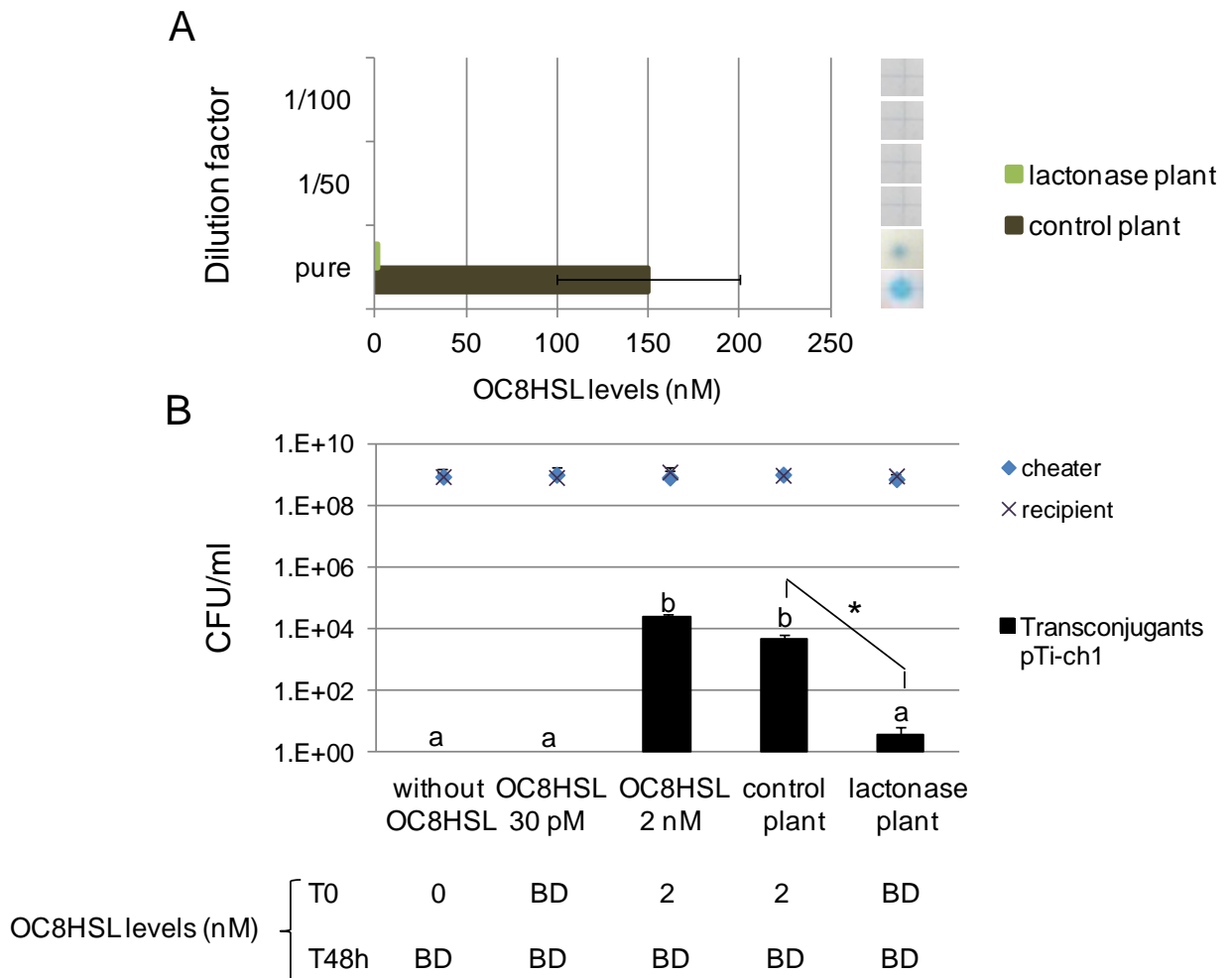
#### 3.6.1 Cinétique de dégradation de l'OC8HSL par des tabacs exprimant la lactonase AttM

Des plantules de tabacs exprimant ou non la lactonase AttM ont été placées dans 1ml de MS/2 supplémenté de différentes concentrations d'OC8HSL et des prélèvements ont été effectués à différents temps. Dès 24 h d'incubation, le niveau d'OC8HSL est fortement diminué en présence de tabacs exprimant la lactonase AttM. Après 72h d'incubation, l'OC8HSL est indétectable dans le milieu de culture des plantules en présence de tabacs n'exprimant pas la lactonase AttM (Fig. 10). L'expression de la lactonase AttM dans les tabacs confère à la plante la capacité de modifier rapidement le niveau extracellulaire d'OC8HSL dans le milieu de culture.



**Figure 10: Degradation of OC8HSL by transgenic tobacco plants expressing a bacterial lactonase**

OC8HSL was added at different concentrations in the liquid growth media MS/2 of the two tobacco lines expressing or not the bacterial lactonase. Residual OC8HSL was quantified at different times. Assays were repeated 12 times for each tobacco line. Averaged values are shown.

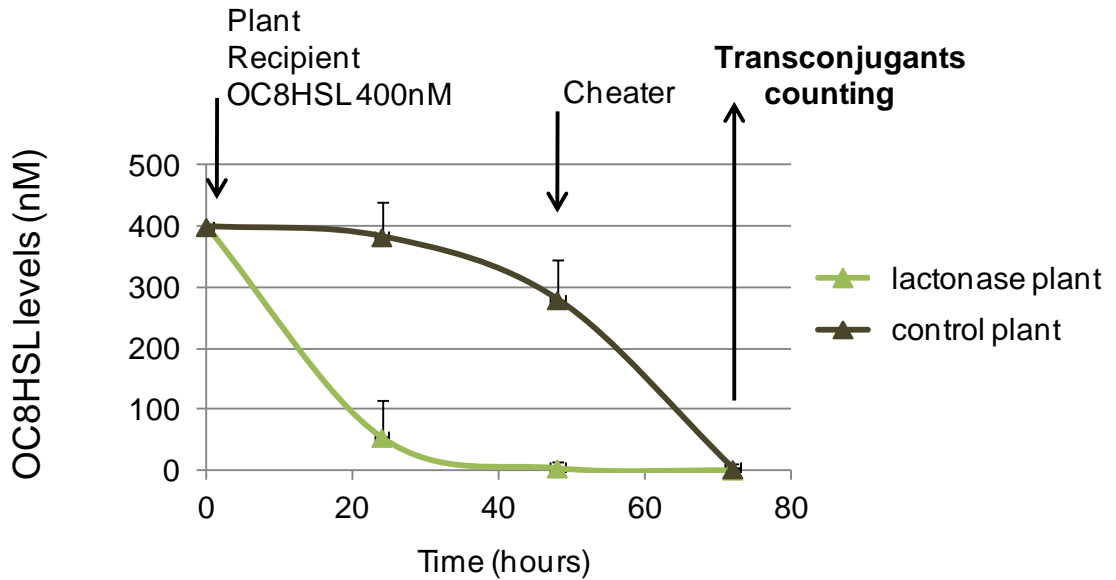


**Figure 11: Plant can disturb plasmid conjugation by modulating NAHL levels**

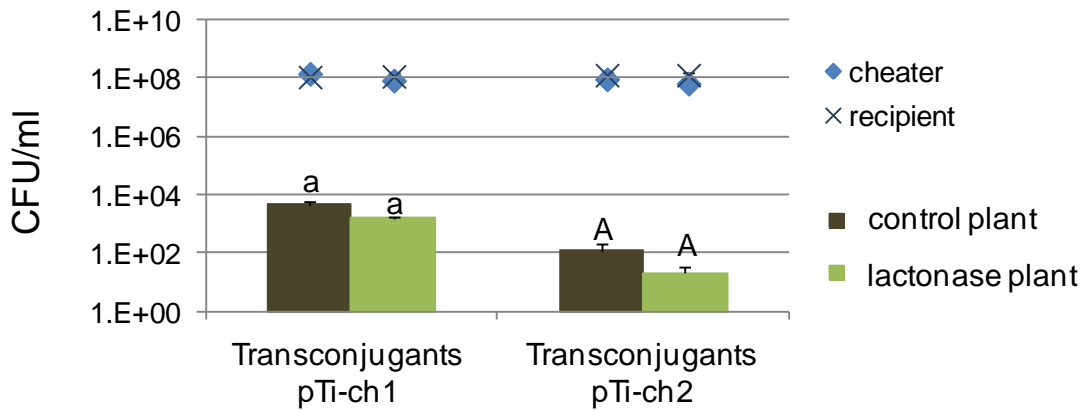
A Tobacco plants were incubated in MS/2 medium supplemented with 400 nM of OC8HSL. After 48 h of incubation at 24°C, 5  $\mu$ L of pure and diluted (1/50 and 1/100) culture medium from control plant or lactonase-expressing plant cultures were spotted on TLC plate for quantifying OC8HSL level.

B Two-partner conjugation assays with cheater 1 and the recipient C58.00 were performed in presence of the diluted (1/50) culture medium from tobacco plants. A condition without OC8HSL and two conditions with 30 pM or 2 nM of OC8HSL were used as negative and positive controls respectively. Transconjugants were measured 24 hours after introduction of cheaters and are expressed in CFU per milliliter of medium. Levels of OC8HSL were measured at time zero and at the introduction of the cheater. Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Kruskall & Wallis,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

A



B



**Figure 12: Conjugation assays in NAHL-degrading plant rhizosphere**

Seedlings of tobacco plant were cultivated in MS/2 culture in presence of the OC8HSL at 400 nM and recipient strain C58.00. Cheaters were introduced 48 hours after. In A, level of OC8HSL was measured in the culture medium. In B, all populations and transconjugants were measured 24 hours after the introduction of cheaters and are expressed in CFU per milliliter of medium. Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

### 3.6.2 Evaluation *in vitro* du rôle des plantes dégradant les signaux QS sur la conjugaison des tricheurs

Les milieux de culture de plantules de tabacs incubées dans 1ml de MS/2 supplémenté de 400nM d'OC8HSL pendant 48 h ont été regroupés par 4, et 5µL de chaque mélange de surnageants ont été déposés sur plaque TLC pour définir le niveau d'OC8HSL (Fig. 11A). Environ 150 nM d'OC8HSL ont été mesurés dans le surnageant des plantes témoin et 3 nM dans celui des plantes exprimant la lactonase. Ces surnageants dilués au 1/50 et 1/100 contenant de l'OC8HSL résiduelle ont ensuite été utilisés pour induire le transfert du plasmide Ti du tricheur Ch1 (Fig. 11B). Des apports de NAHL pure à 2 nM et 30 pM servent de témoins. Le nombre de transconjugants est significativement plus faible lorsque le surnageant ajouté provient de culture de tabacs exprimant la lactonase. Le nombre de transconjugants observé lorsque le milieu provient de la culture de la lignée non lactonase est semblable à celui en présence de 2 nM d'OC8HSL.

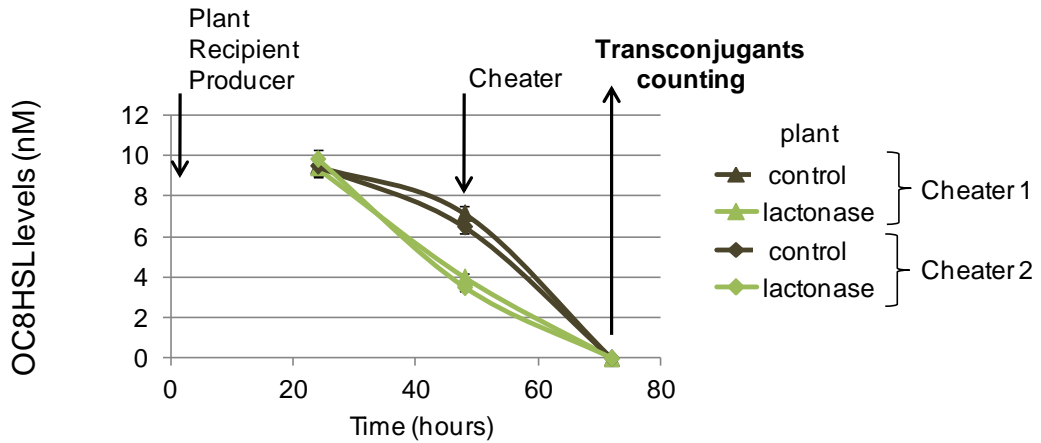
Cette expérience montre que l'expression d'une lactonase dans une plante peut créer un différentiel dans le niveau de NAHL suffisant pour affecter le transfert conjugatif d'un tricheur. Mais que ce passe-t-il si les tricheurs sont directement introduits dans la rhizosphère des plantules ?

Les tabacs sont placés dans 1ml de MS/2 supplémenté de 400nM d'OC8HSL (Fig. 12), ou en présence du mutant C58pTi-*accR* (Fig. 13).

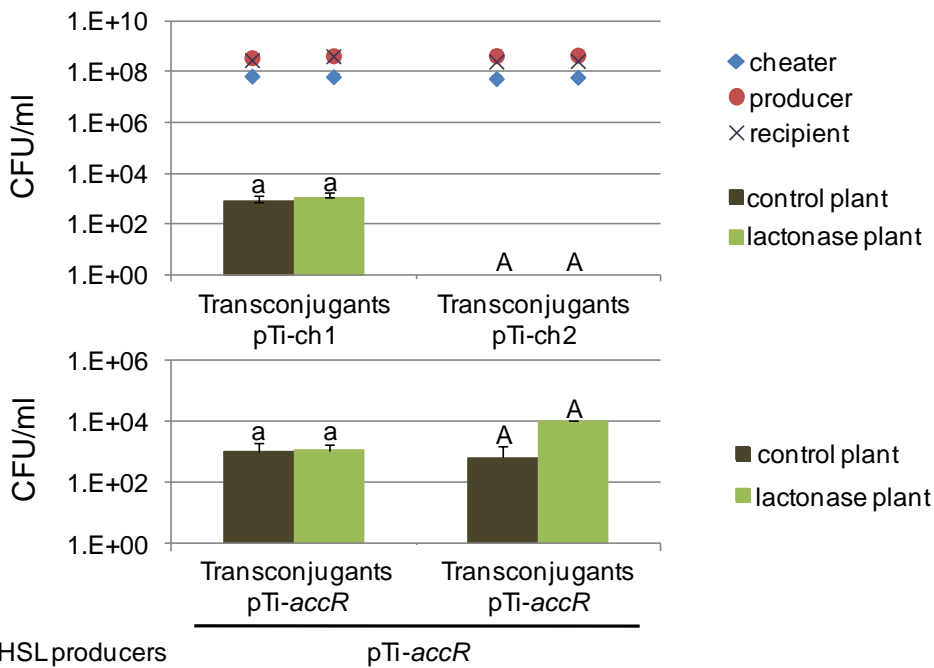
Lorsque les tricheurs sont introduits 48 h après l'apport d'OC8HSL à 400 nM, les niveaux d'OC8HSL mesurés sont de 280 nM en présence des plantes témoins et inférieur au seuil de détection quand les tabacs exprime AttM (Fig. 12A). Cependant, aucune différence du nombre de transconjugants en présence de l'un ou de l'autre des deux tricheurs Ch1 et Ch2 n'est observée (Fig. 12B).

Lorsque le mutant C58pTi-*accR* est utilisé comme producteur, les niveaux d'OC8HSL à l'introduction des tricheurs sont entre 3 et 7 nM (Fig. 13A). Aucune différence du nombre de transconjugants en présence de l'un ou l'autre des deux tricheurs Ch1 et Ch2 n'est observée (Fig. 13B). Le transfert du plasmide Ti du mutant C58pTi-*accR* a aussi été mesuré, mais aucun effet de l'expression d'AttM par la plante n'a été observé.

A



B



**Figure 13: Conjugation assays in NAHL-degrading plant rhizosphere in presence of OC8HSL-producers**

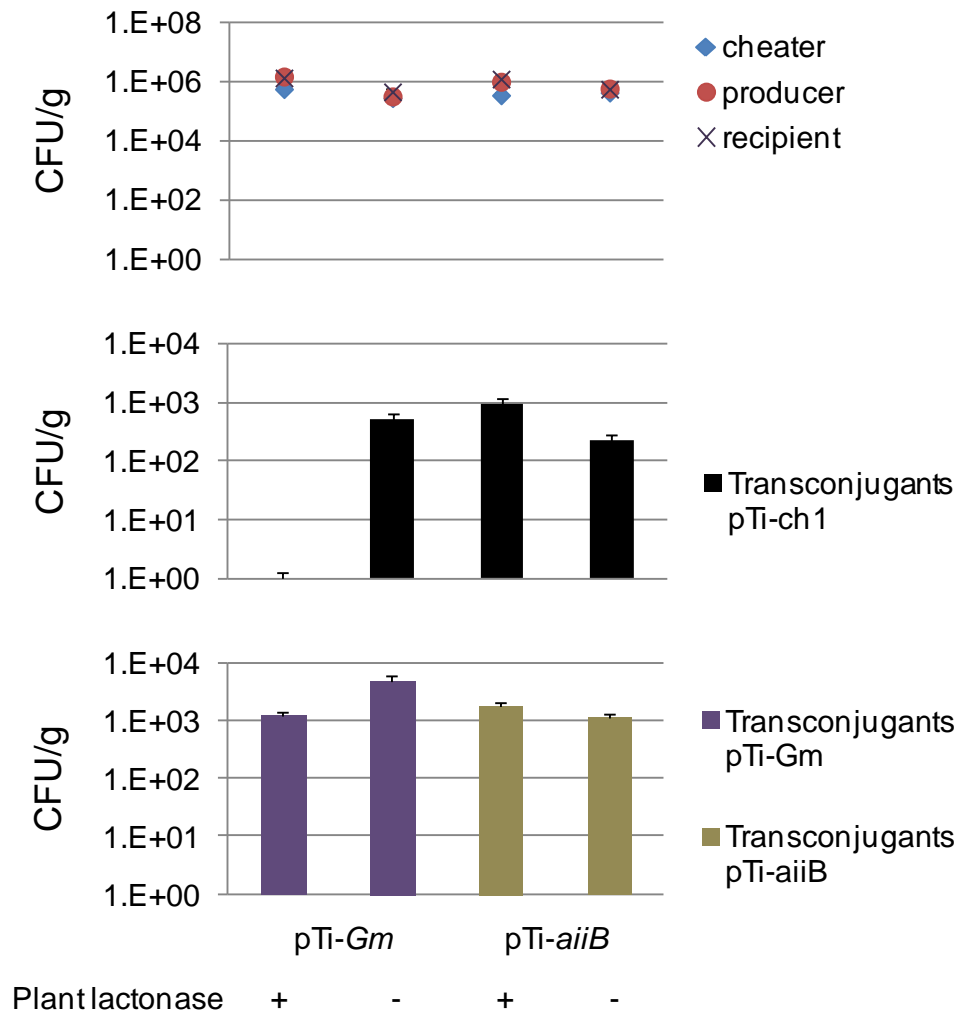
Seedlings of tobacco plant were cultivated in MS/2 culture in presence of the OC8HSL-producer C58-*accR* and recipient strain C58.00. Cheaters were introduced 48 hours after. In A, level of OC8HSL was quantified in culture medium. In B, all the populations and transconjugants were counted 24 h after introduction of the cheater and are expressed in CFU per milliliter of medium. Measurements were performed in quadruplicate and the experiment was repeated once. Statistically different values (Mann & Whitney,  $\alpha=0.05$ ) are noted by different letters.

Dans les conditions expérimentales ci-dessus, c'est-à-dire dans un environnement de type rhizosphère, aucun effet de l'expression de la lactonase par la plante n'est observable sur le transfert de plasmide Ti d'un tricheur.

### 3.7 Evaluation du rôle des plantes dégradant les signaux QS sur la conjugaison des tricheurs dans les tumeurs

D'autres tests de conjugaison ont été réalisés sur les tabacs exprimant la lactonase AttM. Le transfert du plasmide Ti du tricheur Ch1 a été comparé en présence du mutant C58pTi-*Gm* ou C58pTi-*aiiB*. Pour cela, des tabacs exprimant la lactonase ou ne l'exprimant pas ont été co-inoculés avec la réceptrice C58.00, la productrice C58pTi-*Gm* ou C58pTi-*aiiB*, et le tricheur Ch1. Le transfert des pTi-*Gm* et pTi-*aiiB* a été mesuré, ainsi que celui du tricheur Ch1. Les populations inoculées et les transconjugants apparus dans les tumeurs végétales ont été dénombrées 3, 5, et 7 semaines après infection. Seules les données obtenues à 7 semaines sont montrées. Aucun transconjugant provenant du tricheur Ch1 n'est observé quand la plante exprime AttM et que le producteur exprime la lactonase AiiB, bien que le niveau de population total des tricheurs ne soit affecté (Fig. 14). En revanche des transconjugants ayant acquis le plasmide du tricheur sont observés lorsque la plante hôte n'exprime pas la lactonase ou quand le producteur de signaux NAHL est dépourvu d'AiiB. D'une manière remarquable, le transfert du plasmide du producteur de NAHL n'est pas fortement affecté par l'expression des lactonases. Il existerait un effet synergique de l'hôte et du pathogène permettant de contrôler le transfert conjugatif des tricheurs.





**Figure 14: Conjugation assays in tobacco plant expressing the lactonase**  
 Tobacco plants expressing or not the bacterial lactonase AttM were inoculated with a mixture at 1:1:1 ratio of the recipient C58.00, cheater-1, and *A. tumefaciens* C58 derivatives harboring the pTi-Gm or pTi-aiiB. Transconjugants and populations levels were measured 7 weeks post infection. Three replicates per sampling were performed.

## 4 Discussion

Le système expérimental développé a permis dans un premier temps de mesurer le transfert du plasmide Ti de tricheurs (appelés ainsi car ne produisant pas de signaux NAHL) et de montrer que ces tricheurs justifient d'autant plus leur nom qu'ils sont susceptibles de répondre à des signaux produits par d'autres agrobactéries mais également par d'autres genres bactériens. Selon la sensibilité des systèmes QS des tricheurs Ch1 et Ch2, l'effet dose-réponse entre les niveaux de NAHL et de transfert du pTi est différent. Le tricheur Ch1 transfère son plasmide Ti en présence de concentrations de NAHL plus faibles que celles nécessaires au transfert du pTi du tricheur Ch2. Cette observation suggère que des mutations dans les modulateurs de la régulation QS peuvent aboutir à des souches capables de parasiter la régulation QS de façon plus ou moins efficace au sein des populations d'*Agrobacterium*. Ces tricheurs permettent, pour la première fois, d'étudier avec précision l'exploitation des signaux QS par des agrobactéries qui n'ont pas besoin de produire des signaux NAHL afin de transmettre leur propre plasmide Ti. La simple présence de bactéries productrices de NAHL à proximité de tricheurs peut leur permettre de disséminer leur plasmide Ti. Ce système s'avère idéal pour tester l'influence de la dégradation des signaux QS sur la communication intercellulaire et le transfert de gène.

Un résultat important des travaux présentés réside dans le fait qu'une bactérie dégradant les NAHL peut moduler le niveau extracellulaire de NAHL disponible et affecter le transfert du pTi des tricheurs. Dans ce contexte, l'aspect temporel de l'introduction du tricheur doit être pris en compte comme le montrent les cinétiques de dégradation des signaux QS par différentes bactéries. L'introduction de tricheurs doit se faire de manière décalée si l'on veut voir un effet de la dégradation des NAHL sur le niveau de transfert du plasmide Ti. Ce décalage peut être interprété comme une efficacité de protection contre l'invasion par les tricheurs de tumeurs en cours de formation.

D'une manière remarquable, l'effet de la dégradation est le plus marqué lorsque les fonctions de production et de dégradation des signaux QS se réalisent au sein du même organisme. Ceci est cohérent avec la présence des gènes de synthèse (*traI*) et de dégradation (*aiiB*) sur le même pTi chez *A. tumefaciens* C58. Il est important de noter qu'en présence d'opines, aucun effet de la dégradation des signaux QS n'est visible sur le transfert du pTi de la bactérie qui produit et dégrade les signaux tandis que la dissémination du pTi des tricheurs est affectée. Cette dégradation des NAHL n'aurait qu'un coût nul ou négligeable pour le



transfert du pTi de la bactérie produisant les NAHL, mais affecterait significativement celui des tricheurs. Les bactéries receveuses peuvent également contribuer à limiter le transfert du pTi des tricheurs. Cette observation est d'autant plus pertinente que dans la rhizosphère les agrobactéries receveuses possèdent souvent le plasmide At portant la lactonase AttM.

Par ailleurs, l'effet de dégradation par les plantes dans le compartiment tumeur est visible. Dans les expériences de conjugaison dans les tabacs exprimant ou non la lactonase AttM, on observe une apparition plus précoce de transconjugants dont le pTi provient des bactéries coopératrices. Dans la tumeur, il y a un effet synergique de la dégradation par la plante hôte et le pathogène sur la dissémination du pTi des tricheurs. En condition rhizosphérique, l'effet n'est visible que lorsque les surnageants de culture de plantes supplémentés en NAHL sont dilués avant leur utilisation pour induire la conjugaison, suggérant que dans la rhizosphère la plante n'a un effet que limité sur la dégradation des NAHL. Il reste des NAHL résiduelles qui permettent l'activation de la conjugaison des tricheurs. La tumeur végétale apparaît comme un environnement végétal plus contraignant que la rhizosphère quand à la fonction de dégradation des signaux QS.

L'ensemble de ces expériences suggère que la dégradation des NAHL exerce le plus d'effet contre les tricheurs lorsque la lactonase est exprimée par la bactérie productrice ou la bactérie receveuse en présence de faible concentration de NAHL. Ceci correspondrait aux étapes précoces de synthèse des NAHL en présence d'opines. L'effet de la plante est mesurable dans les tumeurs végétales, mais pas dans la rhizosphère. Pour les bactéries productrices de NAHL, il est crucial de limiter le transfert du pTi des tricheurs lors des étapes précoces de la formation des tumeurs afin d'assurer une propagation optimale de son propre plasmide Ti.

L'exploitation des signaux QS par des mutants tricheurs de la signalisation QS au sein d'une même espèce bactérienne a été étudiée chez *Pseudomonas aeruginosa*. Chez cette bactérie, la production d'enzymes extracellulaires comme les élastases nécessaires à l'assimilation de l'élastine des hôtes est régulée par QS et constitue un processus coûteux en énergie. Des mutants de la signalisation QS, assimilés à des tricheurs car ils bénéficient des élastases produites par les bactéries voisines, apparaissent dans les populations bactériennes au cours d'infections (Köhler *et al.*, 2009). Dans le modèle *Pseudomonas aeruginosa*, les tricheurs ont un avantage sélectif immédiat par rapport aux bactéries coopératrices qui produisent les exoenzymes dont le processus est coûteux en énergie. Chez *A. tumefaciens* le



transfert du plasmide Ti d'une bactérie donneuse à une receveuse est régulé par *quorum sensing*. Le transfert du plasmide Ti est également un processus coûteux en énergie car il nécessite la mise en place d'un système de sécrétion de type IV (Lawley *et al.*, 2003). Dans les expériences réalisées, les bactéries nommées tricheurs sont également affectées par le coût du transfert du pTi. Chez *Agrobacterium*, aucune augmentation de fitness des tricheurs n'est observée durant les expériences, le bénéfice revient au plasmide Ti des tricheurs qui est disséminé grâce au comportement coopératif des autres bactéries qui produisent les signaux QS.

Les lactonases bactériennes ou végétales contribueraient à maintenir à un faible niveau dans les populations ce type de plasmide qui ne contribue pas à la production des NAHL au sein de la tumeur.



## Chapitre IV – Discussion générale et perspectives

### 1 *Quorum quenching* et métagénomique

La métagénomique a révolutionné la microbiologie ces dernières années car elle permet de s'affranchir de la culture en laboratoire, et l'accès à une diversité spécifique et fonctionnelle de divers environnements jusqu'alors inaccessible. Les nouvelles technologies de séquençage et l'abaissement des coûts de ces techniques ont également contribué à son développement. Aujourd'hui près de 300 banques métagénomiques dont l'ADN a été extrait d'environnements divers comme le corps humain, le sol ou des écosystèmes marins ont été analysées par des approches spécifiques ou fonctionnelles. L'approche fonctionnelle implique le criblage d'une banque pour une activité résultant de l'expression de gènes de l'ADN métagénomique. L'avantage majeur de cette approche est qu'aucune information concernant les séquences n'est requise. Cette stratégie présente un fort potentiel pour identifier de nouvelles classes de gènes encodant des fonctions déjà connues ou nouvelles. Ainsi, le criblage de banques métagénomiques pour la dégradation de signaux QS de type NAHL a permis la découverte de nouvelles enzymes de dégradation comme QsdA, BpiB01, BpiB04, BpiB05, BpiB07 dont les séquences ne sont pas proches d'autres NAHLases connues (Riaz *et al.*, 2008 ; Bitjenhoorn *et al.*, 2011a et 2011b).

Dans la première partie de mon doctorat, une banque métagénomique d'environ 30 000 clones a été construite à partir d'ADN extrait d'une communauté bactérienne d'une rhizosphère de pommes de terre cultivées en conditions hydroponiques. Le criblage de cette banque a révélé un clone, p90H6, capable de dégrader des NAHL. Le gène *qsdB* « *quorum sensing degradation* » de 1,4 kb a été identifié au sein d'un fragment d'ADN d'environ 40 kb et code la protéine QsdB. L'activité NAHLase a été confirmée par HPLC/MS et il apparaît que QsdB peut dégrader différents types de NAHL substituées ou non comme la C6HSL, la C8HSL et l'OC8HSL. Des analyses phylogénétiques montrent que QsdB ne présente pas d'homologie de séquence avec d'autres enzymes de dégradation des NAHL de la famille des métallob- $\beta$ -lactamases, phosphotriesterases, Ntn-hydrolases ou réductases à chaîne courte. Les protéines présentant la plus forte homologie avec QsdB codent des amidases putatives et ont été identifiées chez deux isolats de *Burkholderia*. L'orthologue chez *B. cepacia* J2315 dont la protéine présente 63% d'identité avec QsdB a été cloné et confère également une activité NAHLase à une souche d'*E. coli* naturellement non dégradatrice. Le criblage de la banque a





donc révélé une nouvelle classe d'enzymes de dégradation des NAHL. Par ailleurs, les deux souches de *Burkholderia* produisent des signaux qui activent les biosenseurs répondant aux NAHL. L'orthologue de QsdB pourrait donc jouer un rôle dans la signalisation QS de la souche J2315 ou dans l'assimilation des NAHL comme source de carbone (Yang *et al.*, 2006).

QsdB et les deux orthologues chez *Burkholderia* forment un sous-cluster dans la famille de protéines présentant une signature amidase (AS) spécifique. Parmi les membres les plus proches de QsdB au sein de cette famille AS, certains ont été caractérisés pour leur capacité à dégrader des composés xénobiotiques notamment issus de l'industrie du nylon comme les enzymes de type Nyl-A identifiées chez *Arthrobacter* et *Pseudomonas* et OctHD chez *Rhodococcus* (Fukuta *et al.*, 2010). QsdB présente 38% et 37% d'identité avec NylA d'*Arthrobacter* et de *Pseudomonas* respectivement et 47% avec OctHD. QsdB possède également 50% d'identité avec la protéine LibA responsable de la dégradation de l'herbicide linuron chez *Variovorax* (Bers *et al.*, 2011). La souche *Rhodococcus* sp. Oct1 qui porte la protéine OctHD a été isolée d'un sol proche de l'université préfectorale de Toyama au Japon dans lequel la présence de composés xénobiotiques est supposée faible, pourtant cette souche peut dégrader des composés dérivés de l'industrie du nylon comme l'acide dimère cyclique 6-aminohexanoïque que l'on ne retrouve pas dans la nature (Fukuta *et al.*, 2010). La présence de bactéries possédant de telles activités enzymatiques dans des sols communs suggèrent que ces enzymes n'ont pas évolué spécifiquement en réponse à la pression sélective qu'auraient pu constituer ces composés. Les structures des NAHL, du linuron et des sous-produits du nylon présentant des similarités, les enzymes de dégradation de ces composés xénobiotiques auraient pu évoluer à partir des enzymes à activité NAHLase puis se disséminer par transfert horizontal. L'hypothèse selon laquelle il existerait des similarités de séquence entre ces protéines sans qu'elles partagent le même spectre de substrats est néanmoins tout à fait plausible. Il serait tout de même intéressant de tester l'activité NAHLase de ces protéines et réciproquement, l'activité de QsdB sur des composés xénobiotiques tels que l'acide dimère cyclique 6-aminohexanoïque ou le linuron. Par ailleurs, l'activité de QsdB vis-à-vis des NAHL n'a pas été identifiée. Des tests de recyclisation du cycle lactone par acidification d'un milieu de culture dans lequel la C6HSL ajoutée a été dégradée par QsdB suggèrent que l'activité ne serait pas de type lactonase car aucune réponse du bioindicateur *Chromobacterium* n'est observée. D'après la séquence protéique, QsdB aurait une activité amidase qui en dégradant les molécules de NAHL libère un acide gras et l'homosérine lactone. La détection de l'homosérine lactone dans des extraits bruts de culture d'*E. coli*



exprimant *qsdB* porté par le plasmide pMT $\Delta$ XhoI s'est avérée difficile par des techniques d'HPLC/MS. Des essais de dansylation afin d'améliorer la détection et la quantification de l'homosérine lactone ont été réalisés. Le chlorure de 1-*dinéthyl-amino-naphtalène-5-sulfonyle* (DANSYL) réagit avec les groupements NH<sub>2</sub> terminaux et donne un dérivé décelable par sa fluorescence jaune. Cependant les résultats n'ont pas été plus convaincants. La dégradation rapide des métabolites issus des NAHL sous l'action de QsdB pourrait expliquer ces résultats négatifs. Une collaboration avec le laboratoire d'enzymologie et de biologie structurale (LEBS) du campus CNRS de Gif sur Yvette nous a permis d'obtenir une quantité suffisante de protéine QsdB purifiée afin de réaliser de nouveaux essais pour confirmer ou infirmer l'activité amidase de QsdB.

L'étude phylogénétique des 34 ORFs putatives portées par le fosmide p90H6 ne permet pas de déterminer l'appartenance exacte de ce fragment d'ADN mais il est probable qu'il provienne d'une  $\beta$ -protéobactérie ou d'une  $\gamma$ -protéobactérie. L'affiliation de QsdB à un phylum bactérien reste cependant difficile de par l'absence d'un gène dont la phylogénie est robuste au sein du clone métagénomique. La présence de deux opérons putatifs impliqués dans le métabolisme de dérivés d'acétophénone qui peuvent être présents dans certaines plantes et dans le catabolisme de l'acide indole 3-acétique, une hormone végétale, suggère que la bactérie dont provient l'insert de 40kb pourrait être une bactérie capable d'interactions avec les plantes. Cette hypothèse est en accord avec l'origine de l'ADN métagénomique qui a été extrait de la rhizosphère de plants de pomme de terre.

Un désavantage des banques métagénomiques est que la plupart des criblages aboutit à l'identification d'un à quelques clones d'intérêt pour des milliers de clones criblés comme ceci est le cas de la banque métagénomique dont est issu le gène *qsdB*. Un des facteurs limitant l'approche fonctionnelle est que de nombreux gènes ne sont que peu ou pas exprimés dans *E. coli* qui est l'hôte le plus souvent utilisé. En effet, certains auteurs estiment que 40% seulement des gènes portés par l'ADN métagénomique sont exprimés dans *E. coli* (Gabor *et al.*, 2004). La plus forte contrainte réside dans les incompatibilités entre les machineries transcriptionnelles et traductionnelles des hôtes et les signaux d'expression (promoteur, site de fixation du ribosome, codon d'initiation, usage des codons, protéines chaperones...) présents dans les gènes portés par l'ADN métagénomique. Plusieurs souches d'*E. coli* sont porteuses d'ARN polymérases ou de protéines ribosomales modifiées pour résoudre une partie des problèmes d'expression hétérologue. L'optimisation des machineries cellulaires d'*E. coli*



et des vecteurs d'expression utilisés devrait en faire un hôte plus compétent dans le futur. L'utilisation d'autres souches hôtes comme *Streptomyces lividans*, *Rhizobium leguminosarum* et *Pseudomonas aeruginosa* ayant des caractéristiques différentes d'*E. coli* en termes d'expression de gènes est également une possibilité. *S. lividans* a prouvé son efficacité pour la recherche de gènes responsable de la synthèse de polyketides d'intérêt pharmacologique au sein d'une banque métagénomique (Courtois *et al.*, 2003). Le criblage d'une même banque avec différents hôtes permet également d'optimiser les chances de trouver de nouveaux gènes d'intérêt (Martinez *et al.*, 2004). Par ailleurs, le choix de la taille des fragments d'ADN est un critère important selon les fonctions recherchées. Ainsi, de petits fragments sont suffisants pour l'identification de nouvelles activités biocatalytiques codés par un seul gène ou un opéron de petite taille (3 à 40 kb) tandis que de grands fragments (>40kb) sont requis pour la découverte de clusters de gènes qui codent des voies de signalisation complexes.

Il existe d'autres moyens d'augmenter la probabilité de trouver de nouveaux gènes d'intérêt comme l'enrichissement des échantillons à partir desquels l'ADN est extrait ou l'extraction d'ADN d'une niche spécialisée. Des gènes conférant la dégradation de la cellulose et du xylane ont notamment été identifiés à partir des bactéries des intestins de termites qui se nourrissent de bois (Warnecke *et al.*, 2007). Cette méthode d'enrichissement a été utilisée pour la banque métagénomique criblée pour la dégradation des NAHL. Les cultures hydroponiques de pommes de terre ont été supplémentées en GCL (1 ou 2 traitements) afin de stimuler la croissance des bactéries dégradatrices de NAHL et d'augmenter leur proportion dans les populations bactériennes. Les données sur les bactéries cultivables confirmant l'efficacité de stimulation par la GCL des populations dégradatrices par rapport à la condition non traitée, le choix de la condition pour la construction de la banque métagénomique s'est dirigé vers la condition traitée deux fois afin d'augmenter la probabilité de trouver des gènes responsables de la dégradation des NAHL.

L'ADN métagénomique sert également à l'étude de la diversité spécifique par utilisation des techniques de séquençage ciblant en général le gène *rrs* qui détermine l'ARNr 16S. Dans le cas de l'étude sur la rhizosphère de pomme de terre traitée ou non à la GCL, les différentes techniques d'analyse de la diversité (DGGE, puces taxonomiques et séquençage 454) ont montré que l'application de GCL induit un fort biais dans les populations bactériennes en plus de stimuler les populations dégradatrices telles que les bactéries du genre *Rhodococcus*. Il y a donc un effet visible de la GCL sur les populations bactériennes au



niveau fonctionnel. Une baisse de diversité dans les échantillons provenant des bacs de cultures hydroponiques traités et une forte stimulation des *alphaproteobacteria* et majoritairement des populations d'*Azospirillum* sont également observées. Il est intéressant de noter que la diversité dans le bac traité une seule fois au début de l'expérience est plus grande que dans le bac traité une deuxième fois à 28 jours comme le montre les indices de diversité et le nombre de clusters identifiés dans chaque condition. Cela suggère que l'impact de la GCL n'est pas rémanent. L'application de la GCL stimule les populations assimilatrices mais lorsque toute la GCL a été consommée, il y a à nouveau compétition pour les autres ressources disponibles et la fitness des bactéries utilisatrices de GCL diminuerait dans ces conditions. De manière remarquable, la proportion des populations d'*Agrobacterium* qui sont pour la plupart dégradatrices de NAHL est plus faible dans les conditions « traitées par GCL ». La stimulation de la croissance d'autres genres bactériens pourrait donc exercer un effet négatif sur la compétitivité d'*Agrobacterium* dans ces conditions.

L'analyse approfondie des différentes séquences affiliées au genre *Azospirillum* pourrait permettre de déterminer si une espèce spécifique du genre *Azospirillum* a été favorisée par le traitement à la GCL ou si plusieurs espèces sont représentées dans ces populations. Aucune activité NAHLase n'a été décrite à ce jour chez ce genre bactérien. Cependant, des données acquises précédemment (Cirou *et al.*, 2007) ont permis d'isoler une souche d'*Azospirillum* capable d'assimiler la GCL comme seule source de carbone, mais incapable de dégrader les signaux NAHL. Dans le cadre d'une stratégie de QQ pour la protection des plants de pomme de terre, la stimulation par la GCL de bactéries non dégradatrices des NAHL pourrait atténuer l'efficacité du traitement. Cependant, comme certaines souches d'*Azospirillum* sont connues pour stimuler la croissance des plantes, un effet bénéfique et inattendu de l'application de la GCL pourrait être observé. L'analyse approfondie de la diversité bactérienne après traitement par la GCL a été réalisée en combinant différentes approches, DGGE, puces taxonomiques et séquençage 454. Bien que les données issues de ces différentes techniques montrent des tendances similaires, l'interprétation des données obtenues doit prendre en compte la possibilité de biais inhérents à chaque méthode. Principalement, les différentes techniques impliquent toutes une étape d'extraction et d'amplification de l'ADN. Il ne peut être exclu que certains ADN bactériens soient préférentiellement extraits ou amplifiés.

Enfin, l'impact du traitement GCL sur la fréquence de certains gènes responsables de la dégradation des NAHL a pu être évalué par une approche de PCR quantitative. Les gènes codant pour des NAHLase peuvent être utilisés comme marqueurs du traitement GCL et





donner une indication sur l'abondance de ces gènes dans les populations. Le nouveau gène découvert, *qsdB*, semble être plus représenté que les gènes *attM* présents chez les *Rhizobiaceae* et *qsdA* chez *Rhodococcus*, et il est plus abondant dans les conditions traitées. Cela apporte donc une information sur le potentiel enzymatique des communautés bactériennes même si l'on ne sait pas encore quels sont les gènes préférentiellement exprimés. La combinaison des différentes approches « omiques » à savoir la métagénomique, la métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique est nécessaire pour lier fonctionnalité et diversité spécifique et pour avoir une vision globale d'un système environnemental.



## 2 *Quorum quenching* dans les interactions bactéries/eucaryotes

Les nouvelles stratégies de *quorum quenching* destinées à lutter contre les infections dues à des pathogènes bactériens dont la virulence est régulée par QS font appel à des procédés d'ingénierie écologique. La perturbation du QS peut se faire à différentes étapes du processus et notamment au niveau de la synthèse du signal, de sa perception par les récepteurs, du transport actif du signal, de la dégradation ou de la séquestration des molécules après sécrétion dans le milieu extracellulaire. La majorité des études concerne la recherche de composés inhibiteurs du QS (QSI) et d'enzymes ou d'organismes qui dégradent les NAHL.

De nombreux QSI naturels ont été identifiés notamment par le criblage de banques métagénomiques ou par le criblage de composés naturels (Guan *et al.*, 2007 ; Rasmussen *et al.*, 2005). Une autre approche consiste en la synthèse de nouvelles molécules comme des analogues structuraux des NAHL potentiellement inhibiteurs du QS (Kim *et al.*, 2009). L'utilisation de ces composés permet une étude des systèmes QS mais pas encore leur application réelle en tant que molécules thérapeutiques. Deux facteurs sont importants concernant leur application potentielle: l'efficacité et la sélectivité de la molécule envers la cible choisie (Galloway *et al.*, 2011). L'étude des relations structure – activité des molécules devrait permettre de définir les critères moléculaires nécessaires à l'activité biologique désirée. De même, la compréhension des mécanismes naturels de QQ, comme ceux intervenant lors de l'interaction *Agrobacterium tumefaciens*- plante hôte, facilitera l'amélioration des stratégies QQ.

Des stratégies autres que la recherche de QSI visent la dégradation des signaux QS. L'expression de la lactonase AiiA dans des plants de tabacs et de tomate atténue les symptômes induits par *Pectobacterium* (Dong *et al.*, 2001). L'expression d'enzymes de dégradation dans le pathogène permet également de réduire son agressivité comme le montre les tests d'inoculation de tubercules de pomme de terre par une souche de *Pectobacterium* exprimant QsdB. Cependant ces approches ne sont pas concevables dans le cadre d'une application industrielle en Europe au regard des réglementations sur les organismes génétiquement modifiés. L'utilisation d'agents de lutte microbiens naturels est en revanche possible (Uroz *et al.*, 2003). En accord avec ce qui précède, des bactéries qui favorisent la croissance des plantes comme *Azospirillum* ou *Azotobacter* font déjà l'objet de formulations commercialisées. Une des approches les plus innovantes pour la lutte contre *Pectobacterium* est développée au laboratoire et concerne le couplage d'un agent de lutte biologique,



*Rhodococcus erythropolis* R138 qui présente une forte activité de dégradation des NAHL, et de la molécule biostimulante GCL assimilée par *Rhodococcus* et utilisée dans le cadre des essais en cultures hydroponiques. Des essais en champ sont menés pour évaluer la possibilité d'une application industrielle. D'hors et déjà, un brevet intitulé « *Chemicals promoting the growth of N-acylhomoserine lactone degrading bacteria* » a été déposé concernant l'utilisation de molécules pour stimuler les populations dégradatrices de NAHL présentes naturellement dans le sol (Faure *et al.*, 2007).

L'existence de nombreuses bactéries qui produisent des signaux QS de type NAHL entraîne des phénomènes de communication croisée. Certaines bactéries utilisent les NAHL produites par une autre bactérie pour coordonner des fonctions qui lui sont propres comme *Burkholderia cenopacia* peut utiliser les signaux produits par *P. aeruginosa* pour augmenter sa production de facteurs de virulence (McKenney *et al.*, 1995). Ce cas d'exploitation des signaux QS par une autre espèce bactérienne s'apparente à un mécanisme de tricherie inter-espèces. En effet, les molécules de NAHL utilisées par *Burkholderia* ne sont plus disponibles pour activer les propres fonctions QS de *Pseudomonas*. Des mécanismes de tricherie intra-espèce peuvent également avoir lieu. Des études de populations de *P. aeruginosa* qui évoluent dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose montrent l'apparition au cours d'infections par *P. aeruginosa* de mutants *lasR* affectés dans la signalisation QS (Köhler *et al.*, 2009). Les mutants *lasR* ne répondent pas aux signaux QS et les fonctions régulées par QS comme la production d'exoenzymes de type élastases ne sont donc pas activées. Néanmoins, ces mutants augmentent en proportion au détriment d'une souche sauvage quand ils sont co-cultivés sur un milieu sélectif sur lequel la production d'élastases est nécessaire à la croissance (Diggle *et al.*, 2007). L'absence du coût énergétique de production de ces exoenzymes confère un avantage sélectif aux mutants assimilés à des tricheurs car ils profitent de l'action des bactéries coopératrices. Les mêmes auteurs montrent qu'une trop forte proportion de tricheurs entraîne une baisse des nutriments disponibles car les bactéries coopératrices ne sont plus assez nombreuses à produire les élastases ce qui aboutit à une baisse de fitness des tricheurs et une diminution de leur fréquence dans les populations.

Contrairement à *Burkholderia* qui utilise directement les signaux QS, les tricheurs chez *Pseudomonas* utilisent les nutriments rendus assimilables par l'action des élastases. Dans ce cas, les tricheurs exploitent l'activité élastase et non pas directement les signaux QS. Cependant, l'abondance des acides aminés dans les poumons de patients infectés par



*Pseudomonas*, source de nutriments pour les bactéries et donc pour de potentiels tricheurs, ainsi que l'isolement fréquent de mutants *lasR* sans détection de souches sauvages collaboratrices dans un même environnement suggèrent que l'avantage sélectif des tricheurs à ne pas produire les exoenzymes seul ne peut expliquer leur prédominance parmi les populations de *P. aeruginosa* (Barth *et al.*, 1996). Au cours des infections chroniques par *P. aeruginosa*, l'apparition de tels mutants serait également favorisée par les conditions environnementales au sein de l'hôte. En effet, chez les patients atteints de mucoviscidose, les populations de *P. aeruginosa* sont soumises à une forte pression de sélection de par la présence de formes réactives de l'oxygène et d'oxydes d'azote et cela aboutit à l'apparition fréquente de mutants et notamment des mutants *lasR* car leur capacité d'utilisation de composés azotés est augmentée et celle de l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons diminuée (Hoffman *et al.*, 2010).

Chez *A. tumefaciens*, le QS contrôle le transfert du plasmide Ti d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. Les bactéries donatrices de pTi peuvent donc rentrer en compétition pour le transfert de leur propre plasmide Ti vers une bactérie réceptrice. *A. tumefaciens* C58 inactive les signaux NAHL par l'action des deux lactonases AttM et AiiB. Dans le cadre de la deuxième partie de mon travail, le rôle d'enzymes de dégradation des NAHL dans la modulation du niveau de signaux NAHL partagés entre les bactéries et plus spécifiquement sur le transfert du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* a été évalué. Le transfert du plasmide Ti implique la mise en place d'un système de sécrétion de type IV qui est un processus coûteux en énergie. Dans les expériences réalisées, les bactéries nommées tricheurs car incapables de produire des signaux NAHL sont également affectées par le coût du transfert du pTi ce qui diffère du système de tricherie de *P. aeruginosa* chez lequel les tricheurs ont un avantage sélectif direct par le fait de ne pas produire les élastases.

Le développement d'un système expérimental pour mesurer le transfert du plasmide Ti de tricheurs dont la présence d'opines n'est pas nécessaire au transfert du plasmide a permis de mettre en évidence la possibilité pour des tricheurs de transférer leur plasmide Ti en réponse à des signaux produits par des *Agrobacterium* mais également par d'autres genres bactériens. Le phénomène de communication croisée peut ainsi favoriser la dissémination de plasmide Ti déficients dans la signalisation QS. Il existe une variabilité au sein des populations d'*Agrobacterium* quant à la signalisation QS. Par exemple, une souche nommée WRT31 isolée au laboratoire à partir d'une rhizosphère de tabacs présente une très forte





capacité de dégradation des signaux QS (D'Angelo-Picard *et al.*, 2005). Des mutations à différents niveaux de la signalisation QS peuvent ainsi aboutir à des souches qui produisent plus ou moins de signaux QS ou à de potentiels tricheurs présentant une sensibilité aux NAHL différentes comme c'est le cas des deux tricheurs utilisés.

La présence de gènes responsables de la production de NAHL et de gènes conférant la dégradation de ces molécules dans le même organisme est rare. Cette situation est observée chez *Agrobacterium* et des bactéries des genre *Pseudomonas* et *Rhizobium*. Chez *P. aeruginosa* PAO1, l'acylase PvdQ a été identifiée. Un mutant *pvdQ* est plus virulent sur nématode (Papaioannou *et al.*, 2009). Cependant, l'impact de PvdQ ou des PONs sur les populations de tricheurs n'a jamais été évalué. Les bactéries du genre *Rhizobium* présentent des systèmes QS et produisent jusqu'à 7 types de NAHL différents (Lithgow *et al.*, 2000). De nombreuses fonctions comme la production d'exopolysaccharides (Hoang *et al.*, 2004), le transfert de plasmide (He *et al.*, 2003), et la nodulation (Daniels *et al.*, 2002) sont régulées par QS. Récemment, plusieurs enzymes responsables de la dégradation des NAHL ont été découvertes chez la souche de *Rhizobium* sp. NGR234 (Krysciak *et al.*, 2011). L'impact de ces enzymes sur les fonctions régulées par QS chez cette bactérie n'a pas encore été étudié. Il est intéressant de noter que des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* comme *Sinorhizobium* sp. peuvent recevoir le plasmide Ti (Teyssier-Cuvelles *et al.*, 1999). Cela élargit les possibilités de dissémination du plasmide Ti et donc du pouvoir pathogène. Il a notamment été montré que l'acquisition du plasmide Ti peut dans quelque cas conférer la capacité de virulence à la bactérie receveuse (Teyssier-Cuvelles *et al.*, 2004).

Dans ce travail, le système d'étude du transfert de pTi développé a permis d'étudier le rôle de l'effet de la dégradation des signaux QS sur le transfert de pTi de tricheurs dans différentes conditions. L'effet de la dégradation est très marqué lorsque les fonctions de production et de dégradation des signaux QS se réalisent au sein du même organisme comme c'est le cas chez *A. tumefaciens* C58 ; il est également démontré que les bactéries receveuses peuvent également contribuer à limiter le transfert du pTi des tricheurs. Dans la rhizosphère les agrobactéries receveuses possèdent souvent le plasmide At portant la lactonase AttM (Haudecoeur *et al.*, 2009a). Cela suggère que les bactéries receveuses pourraient participer à la contre-sélection de la dissémination de plasmides Ti déficients dans la signalisation QS et non coopératifs dans les populations bactériennes rhizosphériques. En présence d'opines, ce qui reflète les conditions les plus proches de la réalité, aucun effet de la dégradation des



signaux QS n'est visible sur le transfert du pTi de la bactérie qui produit et dégrade les signaux tandis que la dissémination du pTi des tricheurs est affectée. Cela est corrélé avec les études précédemment réalisées qui montrent que l'impact de l'expression de AiiB sur le transfert du plasmide Ti de la bactérie dégradatrice de NAHL est faible et transitoire (Haudecoeur *et al.*, 2009a).

Plusieurs études montrent que des cellules de mammifères et des cellules végétales perçoivent et dégradent les signaux NAHL (Teplitski *et al.*, 2011). Par exemple lors d'infection de mammifères et de certains invertébrés par la bactérie *P.aeruginosa*, la 3OC12HSL produite par *P. aeruginosa* induit différentes réactions chez l'hôte comme la modulation de la production d'anticorps et l'inhibition de la production de cytokine dans les lymphocytes T (Telford *et al.*, 1998). Les NAHL sont donc perçues par les hôtes. Les NAHL produites par *P. aeruginosa* permettraient de réduire la réponse inflammatoire, créant ainsi un environnement dans lequel les bactéries peuvent survivre plus facilement. Il est démontré également que les paraoxonases (PONs), qui constituent une famille d'enzymes comprenant trois membres PON1, PON2, et PON3 et qui sont exprimées dans les cellules de nombreux mammifères et notamment dans les cellules épithéliales, peuvent dégrader la 3OC12HSL produite par *P. aeruginosa* et affecter les fonctions régulées par QS comme la croissance des biofilms bactériens (Ozer *et al.*, 2005). L'expression de PON2, qui présente la plus forte activité de dégradation des NAHL, est négativement régulée par la 3OC12HSL dans des cultures de cellules épithéliales (Horke *et al.*, 2010). Les paraoxonases participent donc au contrôle du QS chez *P. aeruginosa*. Cependant, la relation entre le niveau d'expression des PONs et la sévérité de maladies infectieuses chroniques par *P. aeruginosa* doit encore être établie.

Au laboratoire, une activité NAHLase a également été identifiée chez *Lotus corniculatus*, une espèce appartenant à la famille des légumineuses (Delalande *et al.*, 2005). Cette activité est également présente chez *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* et *Vicia faba* (Thèse Emilie Chapelle). Les légumineuses sont capables d'association symbiotique avec les *Rhizobiaceae*. Ces bactéries possèdent un ou plusieurs plasmides symbiotiques qui portent les gènes responsables de la nodulation, du transfert conjugatif du plasmide symbiotique et de la fixation d'azote. Ces gènes peuvent cependant être localisés en îlots sur le chromosome comme chez *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Les Rhizobia peuvent posséder d'autres plasmides mais la plupart des fonctions ne sont pas connues. Ces bactéries présentent des



systèmes de régulation QS impliqués notamment dans la symbiose, la fixation d'azote et le transfert du plasmide symbiotique. Chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, le transfert conjugatif du plasmide pRL1JI est contrôlé par TraI/TraR (Wilkinson *et al.*, 2002). La mutation d'un autre système QS nommé RhII/RhIR affecte l'efficacité de nodulation (Rodelas *et al.*, 1999). Par ailleurs, le système CinR/CinI qui contrôle les autres systèmes QS présents chez cette souche joue un rôle dans la production de bactériocine permettant d'inhiber la croissance des bactéries ne possédant pas le plasmide leur conférant la résistance à cette toxine. De nombreuses fonctions sont donc régulées par QS chez cette bactérie. Chez une souche de *Mesorhizobium loti*, la mutation de un ou plusieurs gènes de synthèse des NAHL affecte drastiquement la nodulation sur lotier. Il a été également montré chez *Rhizobium etli* que des mutants *cinI* pour la synthèse de NAHL ont une efficacité de fixation de l'azote réduite de 60 à 70%. (Daniels *et al.*, 2002). Par ailleurs, dans cette espèce le QS régule le mode natatoire de la bactérie (Daniels *et al.*, 2006). Cela suggère que la dégradation des signaux QS par les plantes ou par les bactéries pourrait jouer un rôle dans l'interaction *Rhizobium*-légumineuses mais celui-ci n'a cependant pas encore été étudié. L'identification des déterminants génétiques de l'activité NAHLase chez les plantes permettra la construction de mutants pour la dégradation des NAHL afin d'étudier son rôle dans l'interaction.

Dans notre système modèle, nous avons utilisé des plants de tabac exprimant constitutivement la lactonase AttM (D'Angelo-Picard *et al.*, 2011) et des plants témoins afin d'évaluer l'impact de la dégradation des NAHL par les plantes sur le transfert du plasmide Ti. Les expériences réalisées *in vitro*, qui miment une rhizosphère dégradatrice de signaux QS n'ont révélé aucun impact de la dégradation des NAHL sur le transfert de pTi sauf si l'on dilue le surnageant de culture des plantes avant leur utilisation pour induire la conjugaison du pTi des tricheurs. En revanche, dans les tumeurs de tabacs, on observe une apparition plus précoce de transconjugants dont le pTi provient des bactéries coopératrices. L'effet de dégradation par les plantes sur le transfert de pTi de tricheurs dans le compartiment tumeur est donc visible. De plus, on observe un effet synergique de la dégradation par la plante hôte et le pathogène sur la dissémination du pTi des tricheurs. Cette observation est d'autant plus remarquable que l'hôte naturel présumé d'*A. tumefaciens* C58 est la plante *Medicago truncatula* connue pour dégrader les signaux QS (Lavire C, données non publiées).

De manière remarquable, il a été également montré que *M. truncatula* synthétise à différents stades de son développement des composés inhibiteurs du QS (Teplitski *et al.*,



2000 ; Gao *et al.*, 2003). La production de molécules QSI ou d'enzymes qui dégradent les NAHL chez différents organismes ajoutent un niveau de complexité à la compréhension de la signalisation QS. Les nombreux exemples d'organismes eucaryotes qui interviennent dans la signalisation QS des bactéries semblent suggérer un rôle important de la signalisation QS dans les interactions bactéries/eucaryotes et notamment dans le cas de bactéries pathogènes ou symbiotiques. Les hôtes eucaryotes auraient développé des mécanismes pour détecter les NAHL dans l'environnement et les signaux NAHL représenteraient des signaux de communication inter-règnes qui permettent aux bactéries d'interagir directement avec les processus de signalisation des hôtes eucaryotes (Shiner *et al.*, 2005).

Durant les expériences menées chez *Agrobacterium*, les tricheurs ne présentent aucune augmentation de fitness. C'est le plasmide Ti des tricheurs qui tire avantage de la situation car il est disséminé grâce au comportement coopératif des autres bactéries qui produisent les signaux QS. De manière remarquable, les gènes impliqués dans le système QS chez *A. tumefaciens* et *Rhizobium* sont principalement portés par des plasmides. Il a été montré que de nombreux éléments mobiles chez les bactéries comme *E. coli* portent des gènes codant pour des biens communs. La présence de tels gènes sur des éléments mobiles ou sur des plasmides suggère l'importance de la possibilité de donner - par transfert horizontal - des gènes conférant des comportements coopératifs aux bactéries qui les portent.

Chez *Agrobacterium*, le pTi confère un avantage sélectif car il porte les gènes nécessaires à l'assimilation des opines produites par la plante après transfert de l'ADN-T dans son génome. Il est connu que les exsudats racinaires exercent une pression de sélection sur les populations bactériennes rhizosphériques (Hartmann *et al.*, 2009). Des plants de *Lotus* génétiquement modifiés pour produire des opines induisent des changements dans la structure des communautés bactériennes (Oger *et al.*, 1997). Une méthode afin d'étudier les bactéries qui assimilent le mieux les composés de plante est la technique SIP pour Stable Isotope Probing (Dumont *et al.*, 2006). Cette méthode implique l'utilisation de carbone  $^{13}\text{C}$  qui est incorporé par la plante puis secrété dans la rhizosphère par les exsudats racinaires. Les bactéries qui ont assimilé des exsudats produits avec le carbone  $^{13}\text{C}$  sont plus lourdes, l'isolement des bactéries assimilatrices implique donc une étape de centrifugation afin de les identifier par la suite. L'utilisation de plantes modifiées pour l'expression de composés d'intérêt, combinée à cette technique SIP permettra d'étudier les biais trophiques induits par les plantes sur les communautés bactériennes.





## Perspectives

La découverte de QsdB à partir de la banque métagénomique dont l'ADN provient d'une communauté bactérienne rhizosphérique modifiée par l'ajout de GCL a permis de définir une nouvelle classe d'enzyme capable de dégrader les NAHL. Il est cependant nécessaire de confirmer ou d'infirmer l'activité amidase de QsdB. Sa caractérisation approfondie permettra également d'évaluer sa capacité à dégrader un plus ou moins large spectre de NAHL mais aussi des composés xénobiotiques dégradés par les protéines proches de QsdB. Inversement, il pourrait être envisagé de cloner les gènes codant les protéines OctHD, NylA, et LibA chez *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Variovorax* respectivement, et de tester leur activité NAHLase.

Le gène orthologue à *qsdB* chez *Burkholderia cenocepacia* J2315 confère la dégradation de NAHL à une souche *E. coli*. La construction d'un mutant de cette souche J2315 pour ce gène pourrait permettre d'étudier son rôle dans les fonctions régulées par QS chez cette bactérie. Des analyses transcriptomiques comparant une souche sauvage et une souche mutée en présence de NAHL nous permettra de voir si cette enzyme exerce un effet sur l'expression de gènes par la dégradation des signaux QS.

En ce qui concerne l'étude de la dégradation des NAHL sur le transfert de pTi de tricheurs, il serait intéressant de regarder l'occurrence de tricheurs naturels dans une rhizosphère. Il a été montré *in vitro* et chez de patients infectés par *P. aeruginosa* que des mutants de la signalisation QS apparaissent au cours de l'infection. La recherche de l'apparition de mutants de la signalisation dans la tumeur inoculée par une souche d'*A. tumefaciens* sauvage pourrait être envisagée. Cela permettra de mieux comprendre la dynamique des populations d'agrobactéries au sein des tumeurs.

Il pourrait être aussi envisagé d'exploiter ces résultats expérimentaux à l'aide de modélisations de la dynamique et de l'évolution de ces différentes populations et du maintien en leur sein de gènes codant la dégradation des NAHL. Ces simulations pourraient donner une perspective évolutive à ces travaux expérimentaux conduits sur de courtes échéances de quelques jours *in vitro* à quelques semaines *in planta*.



Enfin, l'identification du déterminant génétique responsable de la dégradation des NAHL chez *Medicago truncatula*, en cours au laboratoire, permettra la construction de lignées végétales mutantes pour ce gène. Des essais de virulence et de transfert du plasmide Ti avec *A. tumefaciens*, mais aussi de nodulation avec des souches de *Rhizobium* chez lesquelles le QS régule la nodulation mais aussi le transfert du plasmide symbiotique, sur des plantes dégradant les NAHL et des plantes mutées permettront d'étudier l'effet de la dégradation des NAHL par les Légumineuses dans leurs interactions avec les alphaprotéobactéries des genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*.



## Bibliographie

Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G., and Tawfik, D.S. (2006) The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry* **45**: 13677-13686.

Ahmer, B.M.M. (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* **52**: 933-945.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B. *et al.* (2001) *gfp*-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 575-585.

Antoine, R., and Locht, C. (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Molecular Microbiology* **6**: 1785-1799.

Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Gorg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M. *et al.* (2003) Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology* **5**: 1350-1369.

Axelrood, P.E., Rella, M., and Schroth, M.N. (1988) Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1222-1229.

Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P.C., Stewart, G., and Williams, P. (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia-carotovora*. *Biochemical Journal* **288**: 997-1004.

Barnard, A.M.L., and Salmond, G.P.C. (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**: 415-423.

Barth, A.L., and Pitt, T.L. (1996) The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* **45**: 110-119.

Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. (1993) Intercellular signaling in *Vibrio-harveyi* - sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* **9**: 773-786.

Beck von Bodman, S., Hayman, G.T., and Farrand, S.K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 643-647.

- Bers, K., Leroy, B., Breugelmanns, P., Albers, P., Lavigne, R., Sorensen, S.R. *et al.* (2011) A novel hydrolase identified by genomic-proteomic analysis of phenylurea herbicide mineralization by *Variovorax* sp strain SRS16. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 8754-8764.
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., and Streit, W.R. (2011a) BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. *Journal of Biotechnology* **155**: 86-94.
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Mueller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C. *et al.* (2011b) A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *Plos One* **6**.
- Bouzar, H., Ouadah, D., Krimi, Z., Jones, J.B., Trovato, M., Petit, A., and Dessaux, Y. (1993) Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1310-1317.
- Boyer, M., and Wisniewski-Dyé, F. (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* **70**:1-19.
- Brader, G., Sjoblom, S., Hyytiainen, H., Sims-Huopaniemi, K., and Palva, E.T. (2005) Altering substrate chain length specificity of an acylhomoserine lactone synthase in bacterial communication. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 10403-10409.
- Carrier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y., and Faure, D. (2004) The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 951-957.
- Carrier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., and Faure, D. (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4989-4993.
- Case, R.J., Labbate, M., and Kjelleberg, S. (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME Journal* **2**: 345-349.
- Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., Garcia-de-los-Santos, A., Davila, G., and Brom, S. (2002) *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid* **48**: 104-116.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., and Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1119-1129.
- Chai, Y., Zhu, J., and Winans, S.C. (2001) TrIR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrIR: TraR dimers. *Molecular Microbiology* **40**: 414-421.

- Chatterjee, A., Cui, Y.Y., Hasegawa, H., Leigh, N., Dixit, V., and Chatterjee, A.K. (2005) Comparative analysis of two classes of quorum-sensing signaling systems that control production of extracellular proteins and secondary metabolites in *Erwinia carotovora* subspecies. *Journal of Bacteriology* **187**: 8026-8038.
- Chatterjee, A.K., Buchanan, G.E., Behrens, M.K., and Starr, M.P. (1979) Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 94-102.
- Chen, L.S., Chen, Y.C., Wood, D.W., and Nester, E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **184**: 4838-4845.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B.J., Ron, E., and Faure, D. (2006) GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 7460-7464.
- Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974) *Agrobacterium-tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 3672-3676.
- Cho, H., Pinto, U.M., and Winans, S.C. (2009) Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. *Journal of Bacteriology* **191**: 3375-3383.
- Cho, H.B., and Winans, S.C. (2005) VirA and VirG activate the Ti plasmid *repABC* operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14843-14848.
- Cho, K.Y., Fuqua, C., Martin, B.S., and Winans, S.C. (1996) Identification of *Agrobacterium tumefaciens* genes that direct the complete catabolism of octopine. *Journal of Bacteriology* **178**: 1872-1880.
- Choi, S.U., Lee, C.K., Hwang, Y.I., Kinoshita, H., and Nihira, T. (2003) gamma-butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Archives of Microbiology* **180**: 303-307.
- Chowdhary, P.K., Keshavan, N., Nguyen, H.Q., Peterson, J.A., Gonzalez, J.E., and Haines, D.C. (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry* **46**: 14429-14437.
- Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P. (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2752-2757.



- Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., and Greenberg, E.P. (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3587-3590.
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., and Faure, D. (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environmental Microbiology* **9**: 1511-1522.
- Cirou, A., Raffoux, A., Diallo, S., Latour, X., Dessaux, Y., and Faure, D. (2011) Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Research in Microbiology* **162**: 945-950.
- Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1994a) Evidence for involvement of a volatile extracellular factor in *Pseudomonas-solanacearum* virulence gene-expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 621-630.
- Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1994b) Evidence for involvement of a volatile extracellular factor in *Pseudomonas-solanacearum* virulence gene-expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 621-630.
- Coenye, T. (2010). Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilms and quorum sensing. *Future Microbiol* **5**:1087-1099.
- Costechareyre, D., Bertolla, F., and Nesme, X. (2009) Homologous recombination in *Agrobacterium*: potential implications for the genomic species concept in bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **26**: 167-176.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F. *et al.* (2010) Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. *Microbial Ecology* **60**: 862-872.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck, G. *et al.* (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 49-55.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C.K., and Chatterjee, A.K. (1995) Identification of a global repressor gene, RSMA, of *Erwinia-cavotavora* subsp *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *Journal of Bacteriology* **177**: 5108-5115.
- Cui, Y.Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N., and 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. *Journal of Bacteriology* **187**: 4792-4803.

D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Carlier, A., Uroz, S., Raffoux, A., Fray, R., Dessaux, Y. (2004) Dynamics of bacterial populations in the rhizosphere of tobacco plants producing – or not – the quorum sensing signals hexanoyl- and 3-oxohexanoyl-homoserine lactone. *FEMS Microbiol Ecol* **51**: 19–29.

D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., and Dessaux, Y. (2005) Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology* **7**: 1796-1808.

D'Angelo-Picard, C., Chapelle, E., Ratet, P., Faure, D., and Dessaux, Y. (2011) Transgenic plants expressing the quorum quenching lactonase AttM do not significantly alter root-associated bacterial populations. *Research in Microbiology* **162**: 951-958.

Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 470-478.

Daniels, R., De Vos, D.E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V. *et al.* (2002) The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 462-468.

Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K. *et al.* (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14965-14970.

Davey, M.E., and O'Toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 847.

Davis, B.M., Jensen, R., Williams, P., and O'Shea, P. (2010) The Interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for inter-kingdom signaling. *Plos One* **5**.

Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M. *et al.* (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 Microbiology Ecology* **52**: 13-20.

Denervaud, V., TuQuoc, P., Blanc, D., Favre-Bonte, S., Krishnapillai, V., Reimmann, C. *et al.* (2004) Characterization of cell-to-cell signaling-deficient *Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 554-562.

Dessaux, Y., Petit, A., Ellis, J.G., Legrain, C., Demarez, M., Wiame, J.M. *et al.* (1989) TI Plasmid-controlled chromosome transfer in *Agrobacterium-tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **171**: 6363-6366.

Diggle, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., and West, S.A. (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**: 411-U417.

Dong, Y.H., and Zhang, L.H. (2005a) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology* **43**: 101-109.

Dong, Y.H., and Zhang, L.H. (2005b) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology* **43**: 101-109.

Dong, Y.H., Wang, L.H., and Zhang, L.H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **362**: 1201-1211.

Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., and Zhang, L.H. (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3526-3531.

Dong, Y.H., Zhang, X.F., Xu, J.L., and Zhang, L.H. (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 954-960.

Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., and Zhang, L.H. (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1754-1759.

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

Draganov, D.I., and La Du, B.N. (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **369**: 78-88.

Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., and La Du, B.N. (2005) Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research* **46**: 1239-1247.

Dumont, M.G., Radajewski, S.M., Miguez, C.B., McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (2006) Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environmental Microbiology* **8**: 1240-1250.

Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium-fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444-2449.

Elias, M., and Tawfik, D.S. (2012) Divergence and convergence in enzyme evolution: parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases. *The Journal of biological chemistry* **287**: 11-20.

Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S. *et al.* (2008) Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. *Journal of Molecular Biology* **379**: 1017-1028.

Escobar, M.A., and Dandekar, A.M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* **8**: 380-386.

Estin, M.L., Stoltz, D.A., and Zabner, J. (2010) Paraoxonase 1, Quorum Sensing, and *P. aeruginosa* Infection: A Novel Model. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology* **660**: 183-193.

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **180**: 5443-5447.

Faure, D., Tannières, M., Mondy, S., Dessaux, Y. (2011). Recent contributions of metagenomics to studies on quorum-sensing and plant-pathogen interactions. In *Metagenomics: current innovations and future trends*. D. Marco (ed.). Caister Academic Press, Norfolk (UK), pp 253-263.

Faure, D., and Dessaux, Y. (2007) Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 353-365.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.

Filomena, S.W. (2011) Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1181-1186

Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* **26**: 251-259.

Frank, S.A. (1998) *Foundation for social evolution*

Fukuta, Y., Koizumi, S., Komeda, H., Asano, Y. (2010). A new aryl acylamidase from *Rhodococcus* sp. strain Oct1 acting on octalactams: its characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microb Technol* **46**:237-245.

Funami, J., Yoshikane, Y., Kobayashi, H., Yokochi, N., Yuan, B., Iwasaki, K., *et al.* (2005) 4-Pyridoxolactonase from a symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*: cloning, expression, and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1753**:234-239.

Fuqua, C. (2006) The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *Journal of Bacteriology* **188**: 3169-3171.

Fuqua, C., Burbea, M., and Winans, S.C. (1995) Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator *traR* is inhibited by the product of the *traM* gene. *Journal of Bacteriology* **177**: 1367-1373.

Fuqua, C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* **50**: 727-751.

Fuqua, W.C., and Winans, S.C. (1994) A LuxI-LuxR type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology* **176**: 2796-2806.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria - the luxr-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**: 269-275.

Gabor, E.M., Alkema, W.B.L., and Janssen, D.B. (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology* **6**: 879-886.

Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., and Spring, D.R. (2011) Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews* **111**: 28-67.

Gao, M.S., Teplitski, M., Robinson, J.B., and Bauer, W.D. (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 827-834.

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B. *et al.* (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323-2328.

Govan, J.R.W., and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoicid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* **60**: 539-+.

Gray, K.M., and Garey, J.R. (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology-Sgm* **147**: 2379-2387.

Guan, C., Ju, J., Borlee, B.R., Williamson, L.L., Shen, B., Raffa, K.F., and Handelsman, J. (2007) Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3669-3676.

Haase, J., Kalkum, M., and Lanka, E. (1996) TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP alpha plasmid RP4. *Journal of Bacteriology* **178**: 6720-6729.

Hamilton, W.D. (1964) Genetical evolution of social behaviour I. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 1-&.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.

Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., and Greenberg, E.P. (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *Journal of Bacteriology* **181**: 5766-5770.

- Hao, Y., Winans, S.C., Glick, B.R., and Charles, T.C. (2010) Identification and characterization of new LuxR/LuxI-type quorum sensing systems from metagenomic libraries. *Environmental Microbiology* **12**: 105-117.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., and Berg, G. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**: 235-257.
- Hastings, J.W., and Mitchell, G. (1971) Endosymbiotic bioluminescent bacteria from light organ of pony fish. *Biological Bulletin* **141**: 261-&.
- Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2009a) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 529-537.
- Haudecoeur, E., Planamentea, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B.J., Morera, S., and Faure, D. (2009b) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14587-14592.
- Hayman, G.T., and Farrand, S.K. (1988) Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline TI plasmid PTIC58. *Journal of Bacteriology* **170**: 1759-1767.
- He, X.S., Chang, W., Pierce, D.L., Seib, L.O., Wagner, J., and Fuqua, C. (2003) Quorum sensing in *Rhizobium* sp strain NGR234 regulates conjugal transfer (tra) gene expression and influences growth rate. *Journal of Bacteriology* **185**: 809-822.
- Heeb, S., and Haas, D. (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1351-1363.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schneider, U., Keel, C., Wade, J. *et al.* (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 232-237.
- Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S. *et al.* (2000) Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. *Journal of Molecular Biology* **302**: 887-898.
- Hoang, H.H., Becker, A., and 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. *Journal of Bacteriology* **186**: 5460-5472.
- Hoffman, L.R., Richardson, A.R., Houston, L.S., Kulasekara, H.D., Martens-Habbena, W., Klausen, M. *et al.* (2010) Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway. *Plos Pathogens* **6**.
- Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeño-Tárraga AM, *et al.* (2009) The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* **191**:261-77.

- Horke, S., Witte, I., Altenhoefer, S., Wilgenbus, P., Goldeck, M., Foerstermann, U. *et al.* (2010) Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochemical Journal* **426**: 73-83.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., and Leadbetter, J.R. (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5941-5949.
- Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M., and Leadbetter, J.R. (2006) Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1190-1197.
- Hwang, I.Y., Smyth, A.J., Luo, Z.Q., and Farrand, S.K. (1999) Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Molecular Microbiology* **34**: 282-294.
- Hwang, I.Y., Li, P.L., Zhang, L.H., Piper, K.R., Cook, D.M., Tate, M.E., and Farrand, S.K. (1994) *traI*, a LuxI homolog, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4639-4643.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R. *et al.* (1993) The Lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO Journal* **12**: 2477-2482.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P. *et al.* (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology-Sgm* **150**: 831-841.
- Kalia, V.C., Raju, S.C., and Purohit, H.J. (2011) Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. *The open microbiology journal* **5**: 1-13.
- Kanagawa, K., Negoro, S., Takada, N., Okada, H. (1989) Plasmid dependence of *Pseudomonas* sp. strain NK87 enzymes that degraded 6-aminohexanoate-cyclic dimer. *J Bacteriol* **171**:3181-3186.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A. *et al.* (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing *Cyanobacterium anabaena* sp strain PCC 7120. *DNA Research* **8**: 205-213.
- Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology* **163**: 1210-1214.
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., Janda, K.D. (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.

- Kempner, E.S., and Hanson, F.E. (1968) Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of Bacteriology* **95**: 975-&.
- Kennedy, J., O'Leary, N.D., Kiran, G.S., Morrissey, J.P., O'Gara, F., Selvin, J., *et al.* (2011) Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J Appl Microbiol* **111**: 787-799.
- Khan, S.R., and Farrand, S.K. (2009) The BlcC (AttM) Lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *Journal of Bacteriology* **191**: 1320-1329.
- Kim, C., Kim, J., Park, H.-Y., Park, H.-J., Kim, C.K., Yoon, J., and Lee, J.-H. (2009) Development of inhibitors against TraR quorum-sensing system in *Agrobacterium tumefaciens* by molecular modeling of the ligand-receptor interaction. *Molecules and Cells* **28**: 447-453.
- Kim, S., and Kim, Y. (2001) Active site residues of cephalosporin acylase are critical not only for enzymatic catalysis but also for post-translational modification. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 48376-48381.
- Kohler, T., Buckling, A., and van Delden, C. (2009) Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6339-6344.
- Koehler, T., Perron, G.G., Buckling, A., and van Delden, C. (2010) Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos Pathogens* **6**.
- Krysciak, D., Schmeisser, C., Preuss, S., Riethausen, J., Quitschau, M., Grond, S., and Streit, W.R. (2011) Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer i molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp Strain NGR234. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 5089-5099.
- Lamarche, M.G., and Deziel, E. (2011) MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *Plos One* **6**.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology* **21**: 1137-1146.
- Latour, X., Diallo, S., Chevalier, S., Morin, D., Smadja, B., Burini, J.-F. *et al.* (2007) Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4078-4081.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A. *et al.* (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 (Reading, England)* **146** ( Pt 10): 2469-2480.



- Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *Fems Microbiology Letters* **224**: 1-15.
- Leadbetter, J.R., and Greenberg, E.P. (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* **182**: 6921-6926.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.N., and Lazdunski, A. (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Molecular Microbiology* **48**: 199-210.
- Lee, J., Jayaraman, A., and Wood, T.K. (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *Bmc Microbiology* **7**.
- Lequette, Y., Lee, J.H., Ledgham, F., Lazdunski, A., and Greenberg, E.P. (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology* **188**: 3365-3370.
- Lerat, E., and Moran, N.A. (2004) Evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 903-913.
- Leveau, J.H.J., Gerards, S. (2008) Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS Microbiol Ecol* **65**:238-250.
- Li, L., Hooi, D., Chhabra, S.R., Pritchard, D., and Shaw, P.E. (2004) Bacterial N-acylhomoserine lactone-induced apoptosis in breast carcinoma cells correlated with down-modulation of STAT3. *Oncogene* **23**: 4894-4902.
- Li, L.-L., Malone, J.E., and Iglewski, B.H. (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *Journal of Bacteriology* **189**: 4367-4374.
- Li, P.L., and Farrand, S.K. (2000) The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the repABC family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing: Regulatory system. *Journal of Bacteriology* **182**: 179-188.
- Li, P.L., Hwang, I., Miyagi, H., True, H., and Farrand, S.K. (1999) Essential components of the Ti plasmid *trb* system, a type IV macromolecular transporter. *Journal of Bacteriology* **181**: 5033-5041.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J.Y., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., and Zhang, L.H. (2003a) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* **47**: 849-860.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J.Y., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., and Zhang, L.H. (2003b) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* **47**: 849-860.
- Lindberg, M., and Norberg, T. (1988) Synthesis of sucrose 4'-(L-arabinose-2-YL phosphate) (Agrocinopine-A) using an arabinose 2-H-phosphonate intermediate. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **7**: 749-755.

Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P., and Downie, J.A. (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology* **37**: 81-97.

Liu, D., Momb, J., Thomas, P.W., Moulin, A., Petsko, G.A., Fast, W., and Ringe, D. (2008) Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures. *Biochemistry* **47**: 7706-7714.

Liu, Y., Cui, Y.Y., Mukherjee, A., and Chatterjee, A.K. (1998) Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Molecular Microbiology* **29**: 219-234.

Lowery, C.A., Dickerson, T.J., and Janda, K.D. (2008) Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chemical Society Reviews* **37**: 1337-1346.

Martinez, A., Kolvek, S.J., Yip, C.L.T., Hopke, J., Brown, K.A., MacNeil, I.A., and Osburne, M.S. (2004) Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2452-2463.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M.S., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., and Bauer, W.D. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1444-1449.

Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P. (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopath* **88**:678-684

McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M. *et al.* (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology-Uk* **143**: 3703-3711.

McDowell, P., Affas, Z., Reynolds, C., Holden, M.T., Wood, S.J., Saint, S., Cockayne, A., *et al.*, (2001) Structure activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**: 503-12

McGowan, S., Sebahia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P.F. *et al.* (1995) Carbapenem antibiotic production in *Erwinia-carotovora* is regulated by carr, a homolog of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology-Uk* **141**: 541-550.

McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. (2008) Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5308-5317.

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

- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., and Pesci, E.C. (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **182**: 2702-2708.
- McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J., and Fuqua, W.C. (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *Fems Microbiology Letters* **154**: 259-263.
- Mei, G.-Y., Yan, X.-X., Turak, A., Luo, Z.-Q., and Zhang, L.-Q. (2010) AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp strain, is a novel N-Acylhomoserine lactonase. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4933-4942.
- Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., and Manco, G. (2005) A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles* **9**: 297-305.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 165-199.
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., and Williams, P. (2001) The *luxM* Homologue *vanM* from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone. *Journal of Bacteriology* **183**: 3537-3547.
- Mocali, S., and Benedetti, A. (2010) Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* **161**: 497-505.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., and Defago, G. (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *Fems Microbiology Ecology* **45**: 71-81.
- Monier, J.M., Demanèche, S., Delmont, T.O., Mathieu, A., Vogel, T.M., Simonet, P., *et al.* (2011) Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Curr Opin Microbiol* **14**: 229-235
- Moore, L.W., Chilton, W.S., and Canfield, M.L. (1997) Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 201-207.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. (2008a) N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *Fems Microbiology Letters* **279**: 124-130.
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., and Ikeda, T. (2008b) Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp strain MIB015. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72**: 1887-1893.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of synthesis and activity of bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* **104**: 313-319.

Nei M., Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Oger, P., Petit, A., and Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology* **15**: 369-372.

Okada, H., Negoro, S., Kimura, H., Nakamura, S. (1983) Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers. *Nature* **16**:306:203-206.

Ozer, E.A., Pezzulo, A., Shih, D.M., Chun, C., Furlong, C., Lulis, A.J. *et al.* (2005) Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiology Letters* **253**: 29-37.

Papaioannou, E., Wahjudi, M., Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Setroikromo, R., Quax, W.J. (2009) Quorum quenching acylase reduces the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Anti Agents and Chem* **53** : 4891-4897

Pappas, K.M., and Winans, S.C. (2003a) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Molecular Microbiology* **48**: 1059-1073.

Pappas, K.M., and Winans, S.C. (2003b) The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid repABC operon. *Molecular Microbiology* **49**: 441-455.

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

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

Passador, L., Tucker, K.D., Guertin, K.R., Journet, M.P., Kende, A.S., and Iglewski, B.H. (1996) Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *Journal of Bacteriology* **178**: 5995-6000.

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

Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1995) A 2nd N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas-aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1490-1494.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **179**: 3127-3132.

- Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Iglewski, B.H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11229-11234.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Cassedelbart, F., and Tempe, J. (1983) Further extension of the opine concept - plasmids in *Agrobacterium-rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular & General Genetics* **190**: 204-214.
- Piel, J. (2011) Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annu Rev Microbiol* **65**: 431-4531.
- Piper, K.R., Vonbodman, S.B., and Farrand, S.K. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium-tumefaciens* regulates Ti-plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.
- Piper, K.R., von Bodman, S.B., Hwang, I., and Farrand, S.K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Molecular Microbiology* **32**: 1077-1089.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and 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 Journal* **12**: 2467-2476.
- Popoff, M.Y., Kersters, K., Kiredjian, M., Miras, I., and Coynault, C. (1984) Classification of *Agrobacterium* strains isolated from clinical specimens. *Annales De Microbiologie* **A135**: 427-442.
- Qin, Y.P., Luo, Z.Q., Smyth, A.J., Gao, P., von Bodman, S.B., and Farrand, S.K. (2000) Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo Journal* **19**: 5212-5221.
- Ramirez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, L., Rodriguez, O., Cevallos, M.A., and Davila, G. (1997) Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology-Uk* **143**: 2825-2831.
- Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O. *et al.* (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology-Sgm* **151**: 1325-1340.
- Raushel, F.M., and Holden, H.M. (2000) Phosphotriesterase: An enzyme in search of its natural substrate. *Advances in Enzymology, Vol 74* **74**: 51-+.
- Redfield, R.J. (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology* **10**: 365-370.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2008) A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environmental Microbiology* **10**: 560-570.

- Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A. *et al.* (1999) Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3816-3823.
- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Camara, M., and Otero, A. (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *Fems Microbiology Letters* **280**: 73-80.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., and Hamood, A.N. (2000) The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* **2**: 1721-1731.
- Ryan, R.P., and Dow, J.M. (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology-Sgm* **154**: 1845-1858.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9505-9509.
- Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G. *et al.* (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* **454**: 595-U596.
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., and Streit, W.R. (2009) Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 224-233.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology* **185**: 2066-2079.
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**: 81-104
- Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P., and Williams, S.C. (2005) Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *Fems Microbiology Reviews* **29**: 935-947.
- Simon, C., and Daniel, R. (2011) Metagenomic analyses: Past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1153-1161.
- Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R. *et al.* (2006) Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and Immunity* **74**: 1673-1682.
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., and Orange, N. (2004) Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora*

subsp *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1269-1278.

Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z.N., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A. *et al.* (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8487-8492.

Smith, R.S., and Iglewski, B.H. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation* **112**: 1460-1465.

Steeven, A.M., and Greenberg, E.P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Essential elements for activation of the luminescence genes. *Journal of Bacteriology* **179**: 557-562.

Stoltz, D.A., Ozer, E.A., Recker, T.J., Estin, M., Yang, X., Shih, D.M. *et al.* (2008) A Common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 35564-35571.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187-209.

Sturme, M.H.J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D.L., Vaughan, E.E., and de Vos, W.M. (2002) Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 233-243.

Su, S.C., Khan, S.R., and Farrand, S.K. (2008) Induction and loss of Ti plasmid conjugative competence in response to the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal. *Journal of Bacteriology* **190**: 4398-4407.

Subramoni, S., and Venturi, V. (2009) LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology-Sgm* **155**: 1377-1385.

Swiderska, A., Berndtson, A.K., Cha, M.R., Li, L., Beaudoin, G.M.J., Zhu, J., and Fuqua, C. (2001) Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator - Interactions with the tram anti-activator. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 49449-49458.

Swift, S., Winson, M.K., Chan, P.F., Bainton, N.J., Birdsall, M., Reeves, P.J. *et al.* (1993) A novel strategy for the isolation of LuxI homologs - evidence for the widespread distribution of a LuxR LuxI superfamily in enteric bacteria. *Molecular Microbiology* **10**: 511-520.

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.

Tateda, K., Comte, R., Pechere, J.C., Kohler, T., Yamaguchi, K., and Van Delden, C. (2001) Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1930-1933.

- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C. *et al.* (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infection and Immunity* **71**: 5785-5793.
- Taupp, M., Mewis, K., and Hallam, S.J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Curr Opin Biotechnol* **22**:465-472.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H. *et al.* (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-1-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infection and Immunity* **66**: 36-42.
- Tempé, J., Petit, A. (1983) Investigations on crown gall guanidines – demonstration of a specific biochemical relation between *Agrobacterium tumefaciens* strains and the tumors they induce. *Curr Cont Agric Biol and Env* **34**: 24.
- Teplitski, M., Robinson, J.B., and 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 637-648.
- Teplitski, M., Mathesius, U., and Rumbaugh, K.P. (2011) Perception and Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells. *Chemical Reviews* **111**: 100-116.
- Teyssier-Cuvelle, S., Mougél, C., and Nesme, X. (1999) Direct conjugal transfers of Ti plasmid to soil microflora. *Molecular Ecology* **8**: 1273-1284.
- Teyssier-Cuvelle, S., Oger, P., Mougél, C., Groud, K., Farrand, S.K., and Nesme, X. (2004) A highly selectable and highly transferable Ti plasmid to study conjugal host range and Ti plasmid dissemination in complex ecosystems. *Microbial Ecology* **48**: 10-18.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Tsuchiya, K., Fukuyama, S., Kanzaki, N., Kanagawa, K., Negoro, S., Okada, H. (1989) High homology between 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolases of *Flavobacterium* and *Pseudomonas* strains. *J Bacteriol* **171**:3187-3191.
- Turner, S.L., and Young, J.P.W. (1995) The replicator region of the rhizobium-leguminosarum cryptic plasmid PRL8JI. *Fems Microbiology Letters* **133**: 53-58.
- Uchiyama, T., and Miyazaki, K. (2010) Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7029-7035.
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.T., Faure, D., Dessaux, Y. (2008) A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzymes defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol* **74**:1357-1366.



- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger P. (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem* **26**:205-216.
- Uroz, S., and Heinonsalo, J. (2008) Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *Fems Microbiology Ecology* **65**: 271-278.
- Uroz, S., Chhabra, S.R., Camara, M., Williams, P., Oger, P., and 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-Sgm* **151**: 3313-3322.
- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A. *et al.* (2003) Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology-Sgm* **149**: 1981-1989.
- Van Delden, C., and Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases* **4**: 551-560.
- Von Rad, U., Klein, I., Dobrev, P.I., Kottova, J., Zazimalova, E., Fekete, A. *et al.* (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **229**: 73-85.
- Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **187**: 4372-4380.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology* **185**: 2080-2095.
- Wang, L., Helmann, J.D., and Winans, S.C. (1992) The *A-tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell* **69**: 659-667.
- Wang, L.H., He, Y.W., Gao, Y.F., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C.Z. *et al.* (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology* **51**: 903-912.
- Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., and Ikeda, T. (2010) AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2524-2530.
- Warnecke, F., Luginbuehl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T. *et al.* (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**: 560-U517.
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 597-607.

White, C.E., and Winans, S.C. (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **362**: 1135-1148.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., and Salmond, G.P.C. (2001) Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **25**: 365-404.

Widder, E.A. (2010) Bioluminescence in the ocean: Origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science* **328**: 704-708.

Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K., and Downie, J.A. (2002) N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *Journal of Bacteriology* **184**: 4510-4519.

Williams, P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology-Sgm* **153**: 3923-3938.

Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C.H., Allen, H.K., and Handelsman, J. (2005) Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6335-6344.

Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2002a) Bacterial cell-to-cell communication: Sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology* **5**: 216-222.

Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2002b) Bacterial cell-to-cell communication: Sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology* **5**: 216-222.

Wood, D.W., and Pierson, L.S. (1996) The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene* **168**: 49-53.

Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K. *et al.* (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2317-2323.

Yang, W.W., Han, J.I., and Leadbetter, J.R. (2006) Utilization of homoserine lactone as a sole source of carbon and energy by soil *Arthrobacter* and *Burkholderia* species. *Archives of Microbiology* **185**: 47-54.

Zanker, H., Vonlintig, J., and Schroder, J. (1992) Opine transport genes in the octopine (OCC) and nopaline (NOC) catabolic regions in Ti plasmids of *Agrobacterium-tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **174**: 841-849.

Zhang, H.B., Wang, L.H., and Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4638-4643.

Zhang, L.H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* **8**:238-244.

Zhang, L., Jia, Y., Wang, L., and Fang, R. (2007) A proline iminopeptidase gene upregulated *in planta* by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Microbiology* **65**: 121-136.

Zhang, Z.G., and Pierson, L.S. (2001) A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4305-4315.

Zhu, J., and Winans, S.C. (1998) Activity of the quorum-sensing regulator TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is inhibited by a truncated, dominant defective TraR-like protein. *Molecular Microbiology* **27**: 289-297.

Zhu, J., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4832-4837.

Zhu, J., Beaver, J.W., More, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **180**: 5398-5405.





## Annexes

Mes contributions à d'autres travaux sont présentées dans cette partie annexe.

### Annexe 1 :

Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2009a) Different Regulation and Roles of Lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 529-537.

### Annexe 2 :

Haudecoeur, E., Planamentea, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B.J., Morera, S., and Faure, D. (2009b) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14587-14592.

### Annexe 3 :

Faure, D., Tannières, M., Mondy, S., and Dessaux, Y. (2011). Recent contributions of metagenomics to studies on quorum-sensing and plant-pathogen interactions. In *Metagenomics: current innovations and future trends*. D. Marco (ed.). Caister Academic Press, Norfolk (UK), pp 253-263.



## ANNEXE 1

Different Regulation and Roles of Lactonases AiiB and AttM in  
*Agrobacterium tumefaciens* C58

Haudecoeur, E., Tannieres, M., Cirou, A., Raffoux, A., Dessaux, Y.,  
and Faure, D.

(2009) *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 529-537.





# Different Regulation and Roles of Lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58

Elise Haudecoeur, Mélanie Tannières, Amélie Cirou, Aurélie Raffoux, Yves Dessaux, and Denis Faure

Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette 91198, France

Submitted 5 September 2008. Accepted 30 December 2008.

The phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58 expresses two lactonases, AttM and AiiB. We showed that expression of the *aiiB* gene was controlled by agrocinopines A and B and required the agrocinopine-ABC transporter Acc, but was not affected by the level of quorum-sensing (QS) signal 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8-HSL). In the presence of agrocinopines, a constructed *aiiB* mutant accumulated OC8-HSL at a level 10-fold higher than that of the wild-type strain, and showed an exacerbated expression of a key QS-regulated function, conjugation of Ti plasmid (in vitro and in planta), as well as an increase of the number of emerging tumors on the host plant. The expression and acyl-HSL-degrading activity of AttM were evident in the presence of wounded tissues; however, in unwounded plant tumors, the QS-regulated functions were weakly affected in an *attM* mutant. By contrast, we observed that *attM* conferred a selective advantage in the course of colonization of plant tumors. Finally, polymerase chain reaction survey of genes *attM* and *aiiB* showed that they were not strictly conserved in the genus *Agrobacterium*. This work proved that the lactonases AttM and AiiB are regulated by different plant signals and are implicated in different functions in the course of the *A. tumefaciens* C58–host interaction.

*Agrobacterium tumefaciens* can infect a broad range of dicotyledonous plants and transfer an oncogenic DNA fragment, the T-DNA, from its tumor-inducing (Ti) plasmid to the nuclear genome of the plant hosts. In transformed plant tissues, expression of T-DNA genes leads to uncontrolled synthesis of growth regulators, auxin, and cytokinins, resulting in formation of a tumor, a phenomenon known as crown gall disease (Escobar and Dandekar 2003). T-DNA also encodes for synthesis of opines (Schell et al. 1979), which are specific growth substrates and signals used by the virulent *Agrobacterium* spp. Some opines, called conjugative opines, are required for synthesis of a quorum-sensing (QS) signal, 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone (OC8-HSL). The QS pathway controls amplification of copy number (Li and Farrand 2000) and conjugative transfer (Piper et al., 1993; Zhang et al. 1993) of Ti plasmid. A link between a high copy number of Ti plasmid and severity of tumor symptoms was established (Pappas and Winans 2003) and, consequently, antivirulence strategies targeting QS have been proposed to attenuate *Agrobacterium*-induced symptoms on plants (Chevrot et al. 2006; Molina et al. 2003).

In *A. tumefaciens* C58–induced tumors, conjugative agrocinopines A and B tightly control synthesis of the OC8-HSL sig-

nal at the transcriptional level. In the presence of these opines, the AccR-mediated transcriptional repression of *arc* operon (*orfA-orfB-splA-traR-mcpA*) is released (Beck von Bodman et al. 1992; Piper et al. 1999); subsequently, transcriptional regulator TraR binds OC8-HSL (Qin et al. 2007), allowing expression of the OC8-HSL-synthase *TraI* at a high level, as well as that of *tra* and *rep* operons which are required for conjugative transfer and control of Ti plasmid replication, respectively. However, the QS pathway is downregulated by a conserved antagonist, TraM, which directly interacts with TraR (Luo et al. 2000; Swiderska et al. 2001): TraM prevents the binding of TraR/OC8-HSL complexes to the target DNA sequences of QS-regulated promoters. In the presence of conjugative opines, the antagonist effect of TraM would be compensated by synthesis of TraR at a high rate.

Enzymatic inactivation of the OC8-HSL signal by lactonases AttM and AiiB is proposed to play a role in the fine regulation of the QS-controlled functions in *A. tumefaciens* C58 (Carlier et al. 2003; Zhang et al. 2002). The expression of AttM is stimulated at the transcriptional level by several plant signals, such as  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) and its byproducts,  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) and succinic semialdehyde (SSA) (Carlier et al. 2004; Chevrot et al. 2006), as well as by salicylic acid (Yuan et al. 2007). The lactonase-encoding gene *attM* is part of the *attKLM* operon, the expression of which is controlled by transcriptional factor AttJ (Chai et al. 2007; Wang et al. 2006; Zhang et al. 2002). In addition to implication of AttM in the GBL-ring cleavage of OC8-HSL, the *attKLM* operon encodes for assimilation of GBL and GHB as a carbon source (Carlier et al. 2004; Chai et al. 2007). On the other hand, the structure of the Ti plasmid-encoded AiiB lactonase is established (Liu et al. 2007) but the regulation of the *aiiB* gene remains unknown (Carlier et al. 2003).

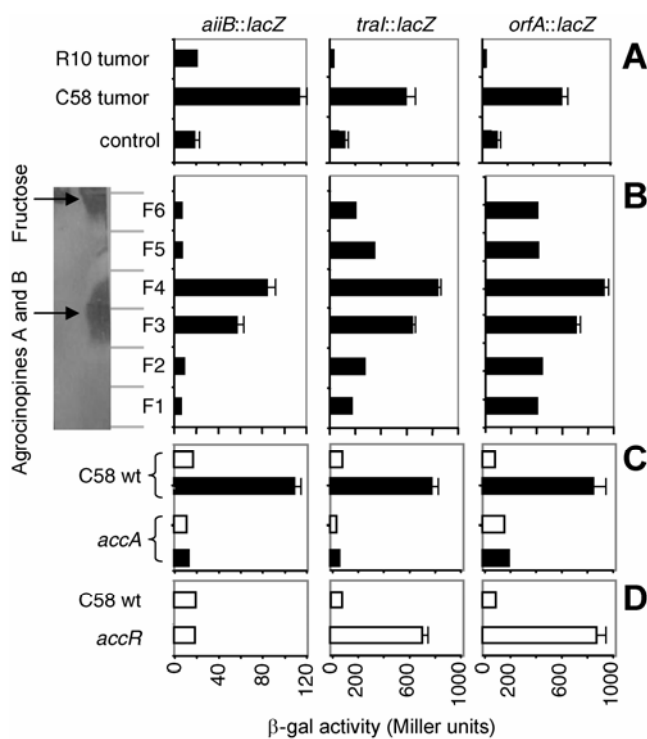
In this work, the regulation of both AttM and AiiB lactonase-encoding genes was compared and their involvement in QS-regulated functions, such as the horizontal transfer of Ti plasmid and the modulation of the number of emerging tumors, was evaluated. Their implication in the colonization of plant tumors by *A. tumefaciens* C58 and their presence in reference strains and soil isolates of the genus *Agrobacterium* were also investigated by polymerase chain reaction (PCR) screening.

## RESULTS

### Agrocinopines induce expression of the *aiiB* gene.

An *aiiB::lacZ* fusion was constructed and recombined into *A. tumefaciens* C58. Several classes of compounds were tested for their ability to induce the *aiiB::lacZ* expression: i) acyl-HSL with short or long acyl chains and, optionally, 3-hydroxy and 3-oxo substituted, such as C4HSL, C6HSL, OC6HSL, OHC6HSL, C8HSL, OC8-HSL, OHC8HSL, C10HSL, and

C12HSL; ii) GBL and compounds exhibiting a GBL ring, such as  $\gamma$ -caprolactone,  $\gamma$ -valerolactone,  $\gamma$ -heptanolactone,  $\alpha$ -acetylbutyrolactone,  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butyrolactone, tetrahydrofuran, tetrahydrofuryl alcohol, succinic anhydride, D-pantoyllactone,  $\alpha$ -methyl- $\gamma$ -butyrolactone, tetric acid, and D-erythronic acid; and iii) other plant compounds such as GABA and acetosyringone, vanillic acid, ferulic acid, and sinapic acid. None of these compounds (applied at up to 1 mM) affected expression of the *aiiB* gene (data not shown). The *aiiB::lacZ* expression assays were also performed in the presence of sections of tomato stems and tumors induced by *A. tumefaciens* strains C58 or R10. The R10 and C58 T-DNAs encode the synthesis of different opines in the plant tumor (Fuqua and Winans 1996; Kim and Farrand 1997), which are octopine, histopine, lysopine, and mannityl opines (R10) and nopaline and agrocinopines A and B (C58). The *traI::lacZ* and *orfA::lacZ* transcriptional fusions of the *tra* and *arc* operons, the expression of which is regulated by agrocinopines, were also constructed and used as a positive control in the course of the agrocinopine tests. Although expression of the *aiiB::lacZ* fusion was not affected by slices of stem or R10-tumor, a 10-fold increase was detected in the presence of slices of C58 tumor (Fig. 1A). These results strongly suggested an opine-dependent expression of the *aiiB::lacZ* fusion. Therefore, induction assays were performed in the presence of purified opines from *A. tumefaciens* C58 tumors. Although the expression of *aiiB* was not affected by



**Fig. 1.** Expression of *aiiB::lacZ* in the presence of agrocinopines A and B. Expression of the *aiiB::lacZ*, *traI::lacZ*, and *orfA::lacZ* transcriptional fusions was measured in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 grown in AB medium supplemented or not (control) with **A**, crude extracts of *A. tumefaciens* C58- or R10-tumors or **B**, electrophoretically separated fractions (F1 to F6) from *A. tumefaciens* C58-tumors. Agrocinopines A and B (fractions F3 and F4) and fructose, used as a nonmigrating marker, were revealed by silver nitrate staining after migration on 3M Whatman paper (B). Expression of the transcriptional fusions was measured in the wild-type background of *A. tumefaciens* C58 as well as the mutants **C**, *accA* and **D**, *accR* in the absence (white bars) or presence (black bars) of crude extracts of C58-induced tumors. All those experiments were done at least in duplicate and generated comparable results. Under the same conditions, the *A. tumefaciens* strain C58, free of any transcriptional fusion *lacZ*, showed an undetectable  $\beta$ -galactosidase activity.

nopaline (data not shown), it was significantly induced by the purified agrocinopines A and B (Fig. 1B).

### The expression of gene *aiiB* requires the agrocinopine-specific ABC transporter *Acc*.

The uptake of agrocinopines A and B and, consequently, the expression of agrocinopine-dependent functions, require the *acc*-encoded ABC-transporter. The expression of *aiiB::lacZ* in the presence of opines is affected in an *accA* mutant (Fig. 1C). This demonstrates that the import of agrocinopines is necessary to induce the expression of the *aiiB* gene. However, no synergistic effect of agrocinopines and OC8-HSL (or C6HSL) on the expression of the *aiiB::lacZ* fusion was observed (data not shown), suggesting that the expression of *aiiB* would be independent of the level of acyl-HSL. The first observation was confirmed in an *accR* mutant, in which the OC8-HSL concentration in culture supernatant was higher than in that of the wild-type strain ( $373 \pm 50$  nM versus  $0.5 \pm 0.2$  nM). The expression of *aiiB::lacZ* fusion in the *accR* and wild-type backgrounds was similar (Fig. 1D), indicating that the pathways for the OC8-HSL biosynthesis (via *AccR*, *TraR*, and *TraI*) and degradation (via *AiiB*) are independent.

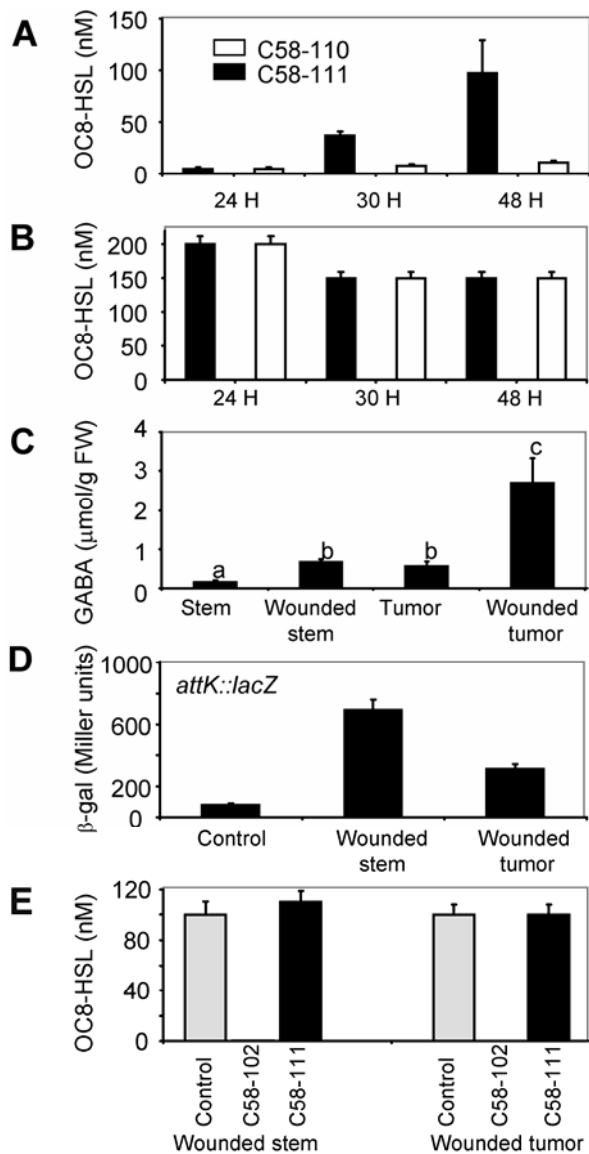
### Both *AiiB* and *AttM* may modulate the accumulation of OC8-HSL.

The implication of *AiiB* in the modulation of OC8-HSL level was evaluated by comparing C58-110 (*attM<sup>-</sup>aiiB<sup>+</sup>*) and C58-111 (*attM<sup>-</sup>aiiB<sup>-</sup>*) mutants. In the absence of agrocinopines, *A. tumefaciens* derivatives C58-110 and C58-111 produced a similar, low level of OC8-HSL (0.5 nM). In the presence of these opines, OC8-HSL concentration in the culture supernatant of C58-110 and C58-111 reached 11 and 98 nM, respectively (Fig. 2A), suggesting that *AiiB* indeed modulates accumulation of the OC8-HSL signal. Remarkably, when a high concentration of OC8-HSL (200 nM) was added at the beginning of the culture, a similar level of OC8-HSL in culture medium of strains C58-110 and C58-111 was observed (Fig. 2B). The addition of OC8-HSL at such high concentration likely saturates the degradation system or strongly activates the synthesis system. In both cases, this experiment suggests that the impact of *AiiB* on the accumulation of OC8-HSL is mostly significant when concentration of the QS signal is limited (e.g., when synthesis begins).

The transcription of the *attKLM* operon is not affected in presence of opines (Carlier et al. 2004) but it is stimulated in the presence of GABA (Chevrot et al. 2006) and its byproducts GHB and SSA (Carlier et al. 2004, 2006; Chai et al. 2007; Zhang et al. 2004). Experiments revealed that the concentration of GABA was higher in tumor ( $0.57 \mu\text{mol/g FW}$ ) than stem tissues ( $0.16 \mu\text{mol/g FW}$ ) and increased rapidly after wounding to reach  $0.68$  and  $2.69 \mu\text{mol/g FW}$  in stem and tumor tissues, respectively (Fig. 2C). Moreover, in the presence of wounded stem and tumor, the *attKLM* operon was expressed (Fig. 2D) and the *A. tumefaciens* C58-102 (*aiiB<sup>-</sup>*) derivative was able to inactivate the added OC8-HSL (Fig. 2E). In contrast, the C58-111 derivative (*attM<sup>-</sup>aiiB<sup>-</sup>*) was not able to degrade OC8-HSL (Fig. 2E), suggesting that, in the presence of wounded plant tissues (stem and tumor), the *AttM* lactonase may efficiently cleave the OC8-HSL signal.

### *AiiB* modulates the conjugation frequency of the Ti plasmid.

The OC8-HSL-degradation ability of *AttM* and *AiiB* suggests that these lactonases would be able to downregulate the QS-regulated horizontal transfer of Ti plasmid. To test this hypothesis, conjugation frequencies were measured using lactonase-defective derivatives as donor strains. *A. tumefaciens* C58.00,



**Fig. 2.** Impact of AiiB and AttM on the accumulation of the 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8-HSL) signal. The level of OC8-HSL was measured in culture supernatants of *Agrobacterium tumefaciens* C58-110 (*attM*) and C58-111 (*attMaiiB*) derivatives in the presence of agrocinopines and in the **A**, absence or **B**, presence of exogenous OC8-HSL (200 nM) that was added at the beginning of the culture. **C**, The level of  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) was measured in tomato stems at infection time and in *A. tumefaciens* C58-induced tumors harvested 5 week postinfection. **D**, The expression of the *attK::lacZ* fusion in *A. tumefaciens* C58 and **E**, the level of OC8-HSL (initially introduced at 200 nM) in cultures of *A. tumefaciens* C58-102 (*aaiB*<sup>-</sup>) and C58-111 (*attM*<sup>-</sup>*aaiB*<sup>-</sup>) were measured in the presence of wounded stem and tumor tissues. A culture of *A. tumefaciens* C58 harboring the *attK::lacZ* fusion in **D**, AB medium and **E**, an uninoculated medium served as controls. The experiments were done in triplicate and bars indicate the standard deviation.

which is lacking Ti and At plasmids, was used as the recipient strain. Ti plasmid conjugation was analyzed in the niche where it naturally occurs, the plant tumor (Table 1). A *traI* donor strain, defective for QS-signal biosynthesis, was used as negative control: no transconjugants were recovered from the conjugation assay. In contrast, transconjugants in tumors infected with C58-105 (*aaiB*<sup>-</sup>*attM*<sup>+</sup>) were much more abundant than in tumors infected with C58-107 (*aaiB*<sup>+</sup>*attM*<sup>+</sup>). The large standard deviation is explained by absence of detection of transconjugants in some tumors. Therefore, the downregulation of Ti plasmid conjugation by the OC8-HSL-cleaving lactonase AiiB is substantial under this experimental condition. Nevertheless, because agrocinopines A and B stimulate the synthesis of abundant OC8-HSL signals, plant tumor remains the most favorable niche for conjugation, as evidenced by the isolation of transconjugants with donor C58-107. However, when the C58-105 (*aaiB*<sup>-</sup>*attM*<sup>+</sup>) and C58-111 (*aaiB*<sup>-</sup>*attM*<sup>-</sup>) donors were compared, the inactivation of *attM* did not stimulate the accumulation of transconjugants (Table 1), suggesting that, in this experiment, the impact of the AttM lactonase on conjugation is limited.

Implication of AiiB in conjugation of Ti plasmid was confirmed by in vitro experiments in the presence of purified agrocinopines A and B. *A. tumefaciens* C58.00 was used as a recipient and strains C58-107 (*aaiB*<sup>+</sup>*attM*<sup>+</sup>) and C58-105 (*aaiB*<sup>-</sup>*attM*<sup>+</sup>) as alternative donors (Fig. 3). The Ti plasmid transconjugants that emerged earlier were those obtained with the lactonase AiiB-defective strain C58-105 as the donor. The higher efficiency for conjugation of this strain was correlated both with an early appearance (at day 2) and a higher level of OC8-HSL in culture medium (Fig. 3).

#### AiiB modulates the emergence of tumors.

The implication of QS in the modulation of virulence (number of emerging tumors) was initially reported in *A. tumefaciens* R10 overexpressing *traR* (Pappas and Winans 2003) and then observed in other *A. tumefaciens* isolates (Chevrot et al. 2006; Molina et al. 2003). To evaluate the contribution of the OC8-HSL-cleaving activity in virulence on whole plants, aggressiveness of wild-type strain C58 was compared with that of its *attM* (C58-110), *aaiB* (C58-102), and *attMaiiB* (C58-111) derivatives. Virulence assays were performed on tomato and tobacco plants under greenhouse culture conditions (Fig. 4). The aggressiveness was measured by counting the number of emerging tumors within each infected gash. All the mutants were more virulent than wild-type strain C58. Remarkably, the *aaiB* mutant was more virulent than the *attM* and *attMaiiB* double mutants; this feature would be explained by the loss of nutritive advantage conferred by AttM in the tumor environment (discussed below). Because the *aaiB* mutant was the most aggressive strain, we performed virulence assays with a complemented *aaiB* mutant that harbored plasmid pMIR103 expressing the AiiB lactonase (Carlier et al. 2003). The complemented mutant *aaiB* was less virulent than the same mutant harboring the empty vector pME6010 (Fig. 4C).

**Table 1.** Conjugation frequencies of tumor-inducing plasmid with C58.00 as a recipient<sup>a</sup>

Donor strains		Conjugation frequency in plant tumors	
Name	Characteristics	Transconjugant/donor	Transconjugant/recipient
C58-107	<i>traI</i> <sup>+</sup> <i>aaiB</i> <sup>+</sup> <i>attM</i> <sup>+</sup>	$2 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-7}$
C58-105	<i>traI</i> <sup>+</sup> <i>aaiB</i> <sup>-</sup> <i>attM</i> <sup>+</sup>	$2 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-5}$
C58-111	<i>traI</i> <sup>+</sup> <i>aaiB</i> <sup>-</sup> <i>attM</i> <sup>-</sup>	$3 \times 10^{-6} \pm 7 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-6}$
C58-115	<i>traI</i> <sup>-</sup> <i>aaiB</i> <sup>+</sup> <i>attM</i> <sup>+</sup>	$<3 \times 10^{-8}$	$<3 \times 10^{-8}$

<sup>a</sup> Values are average values obtained from nine replicates; when no transconjugants were observed, a frequency below detection limit was calculated. Number of recipients includes that of transconjugants.

### AttM contributes to fitness of *A. tumefaciens* C58 in plant tumor.

Competitions between C58-107 (*attM*<sup>+*aiiB*<sup>+</sup>) and C58-110 (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>+</sup>), and between C58-107 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>+</sup>) and C58-105 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) were performed by co-inoculating two strains (at an initial ratio of 1/1) in wounded stems of tomato plants. The percentage of each mutant was measured among agrobacteria collected from emerging tumors. In a first assay performed on six 6-week-old plant tumors, C58-107 represented more than 95% of the tested isolates, therefore dominating C58-110. In contrast, the proportion of C58-107 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>+</sup>) and C58-105 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) remained equal in six 6-week old plant tumors (data not shown). To confirm these results, mutants C58-107 (*attM*<sup>+</sup>) and C58-110 (*attM*<sup>-</sup>) were reconstructed to generate mutant strains independent from those used in the first series of experiments. Competition experiments performed with the second series of mutants (Fig. 5B and D) confirmed that C58-107 (*attM*<sup>+</sup>) was a better fit in the tumor environment than was C58-110 (*attM*<sup>-</sup>). Additionally, a competition assay was performed in tomato rhizosphere, revealing that mutation *attM* had no effect on the fitness of *A. tumefaciens* C58 in this plant environment (Fig. 5A and C).</sup>

### PCR screening of *attM* and *aiiB* genes in *Agrobacterium* strains.

The presence (+) or absence (-) of strong homologs of *attM* and *aiiB* genes was investigated by PCR amplification in several strains, including type strains (T) belonging to *Agrobacterium* spp., as well as in the genomic draft of *A. vitis* S4 and *A. radiobacter* K84 (also referred as *Rhizobium rhizogenes* K84). At the genus level, the analyses yielded the following results: *A. tumefaciens* B6<sup>T</sup> (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>-</sup>), *A. larrymoorei* AF3.10<sup>T</sup> (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>-</sup>), *A. vitis* K309<sup>T</sup> (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) and S4 (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>-</sup>), and *R. rhizogenes* CFBP2408<sup>T</sup> (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) and K84 (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>+</sup>). However, the *Agrobacterium* biovar1 (formally *A. tumefaciens* species) is organized in nine genomic species (G1 to G9) (Popoff et al. 1984), in which *A. tumefaciens* B6<sup>T</sup> and C58<sup>T</sup>

are type strains for G4 and G8, respectively. The *aiiB* or *attM* genes were detected in strains CIP497-74<sup>T</sup> (G2) (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) and Zutra3/1<sup>T</sup> (G7) (*attM*<sup>-</sup>*aiiB*<sup>+</sup>) but seemed to be absent in strains TT111<sup>T</sup> (G1), CIP107443<sup>T</sup> (G3), CIP107444<sup>T</sup> (G5), NCPPB925<sup>T</sup> (G6), and HaywardO363<sup>T</sup> (G9). The amplified *attM* and *aiiB* genes were cloned and expressed in *Escherichia coli* host, to which they conferred the capacity to inactivate NAHL (C6-HSL and OC8-HSL) (data not shown).

The above differences among reference strains prompted investigation of the presence of *attM* and *aiiB* genes in natural agrobacterial populations. *Agrobacterium* biovar1 isolates were recovered from tomato and tobacco rhizospheres (soil from Gif-sur-Yvette, north of France) in which they reached approximately  $7 \times 10^5$  and  $3 \times 10^5$  CFU/g of soil (i.e., 0.5 and 1% of the total cultivable bacterial community), respectively. The 628 isolates were collected from three independent replicates for each of the two host plants. Although none of the isolates yielded a PCR amplification signal with the *aiiB* primers, 93% (tomato host) to 98% (tobacco host) of them positively responded to *attM* amplification assays and inactivated C6-HSL (introduced at 25  $\mu$ M), as strain C58 and A6, after 48 h of incubation (Wang et al. 2006).

Aside from this PCR survey, one cannot exclude that low stringency hybridization would permit the detection of additional *aiiB* and *attM* homologs, of which the encoded protein would exhibit lactonase activity against NAHL.

### DISCUSSION

The regulation and function of the lactonases AttM and AiiB, encoded by the At and Ti plasmids, respectively, of *A. tumefaciens* C58 (Carlier et al. 2003; Zhang et al. 2002), were analyzed. Results revealed that i) the *aiiB* gene is regulated at a transcriptional level by agrocinopines A and B (Fig. 1A and B), and such expression requires the agrocinopine ABC transporter Acc (Fig. 1C); ii) expression of *aiiB* is independent of the level of OC8-HSL and is not repressed by AccR (Fig. 1D); therefore, AiiB does not exert a retrocontrol on QS signal synthesis; iii) in the presence of agrocinopines, the accumulation of OC8-HSL signals is limited by AiiB, but this effect may be bypassed by the addition of an excess of OC8-HSL (Fig. 2); and iv) in an *aiiB* mutant, the Ti plasmid conjugation is increased in vitro (Fig. 3) and in planta (Table 1), as well as the number of emerging tumors (Fig. 4). From these observations, it can be proposed that the TiC58 plasmid-encoded AiiB lactonase contributes to the modulation of QS signaling in *A. tumefaciens* C58. The function of this lactonase cannot be described as a simple on-off regulator but as a fine modulator that essentially delays the release of OC8-HSL in *A. tumefaciens* C58 (Fig. 2) and the horizontal transfer of Ti plasmid (Fig. 3). Noticeably, PCR screening suggests that occurrence of the *aiiB* gene would be rare among representative strains of the *Agrobacterium* genus as well as among soil populations. It was amplified only in a couple of strains, including the biocontrol strain K84. However, one cannot exclude that low-stringency hybridization would permit the detection of other genes encoding AiiB homologs, of which the capacity to inactivate the QS signal should be experimentally tested. Therefore, the AiiB-mediated regulation of QS appears to be a strain-specific characteristic. In the particular case of *A. tumefaciens* C58, the lactonase AiiB is not a unique pathway for downregulation of QS because the crucial implication of the Ti plasmid-encoded regulator TraM is well documented (Luo et al. 2000; Swiderska et al. 2001). Unlike lactonase AiiB that directly acts on OC8-HSL, TraM (via protein-protein interaction with TraR) indirectly limits the production of the OC8-HSL by preventing or inhibiting positive autoregulation on TraI. Questions arise

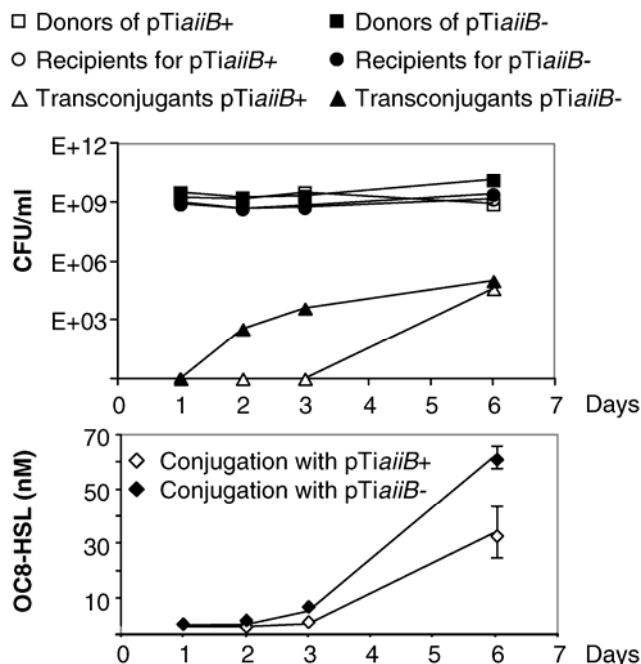
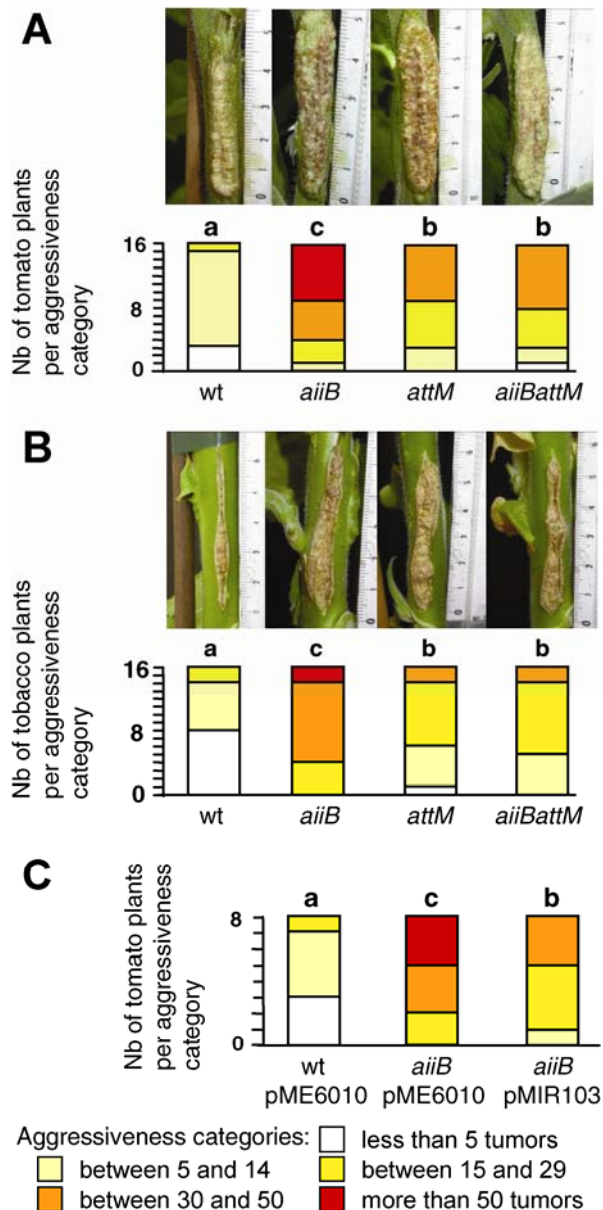


Fig. 3. In vitro conjugation. Emergence of tumor-inducing (Ti) plasmid transconjugants (upper graph) and concentration of 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8-HSL) in culture medium (bottom graph) were monitored in two parallel conjugation assays with recipient strain C58-00 and donor strain C58-105 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>-</sup>) or C58-107 (*attM*<sup>+</sup>*aiiB*<sup>+</sup>). Four replicates were done.

about the biological role of such QS antagonisms in *Agrobacterium*. Both TraM and AiiB would avoid an excessive and inappropriate accumulation of OC8-HSL in the plant environment and, consequently, an activation of the acyl-HSL-induced plant defenses (Mathesius et al. 2003; Schuhegger et al. 2006). Consistent with this hypothesis, the receptor TraR shows a very high affinity (1 to 2 nM) to OC8-HSL signal (Luo and Farrand 2003), while agrocinopines promote an accumulation of OC8-HSL up to 100 nM in an *A. tumefaciens* C58-derivative defective for AiiB (Fig. 2A).

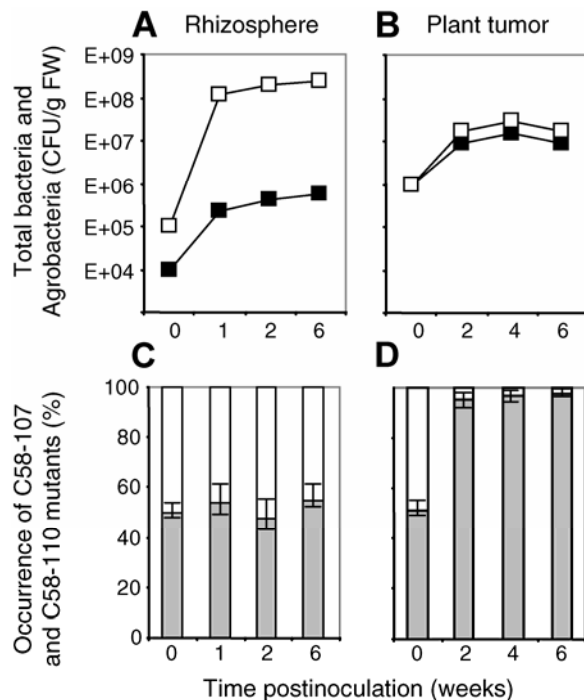
Regulation and functions of the AttM lactonase are more complex than those of AiiB. This work establishes that AttM



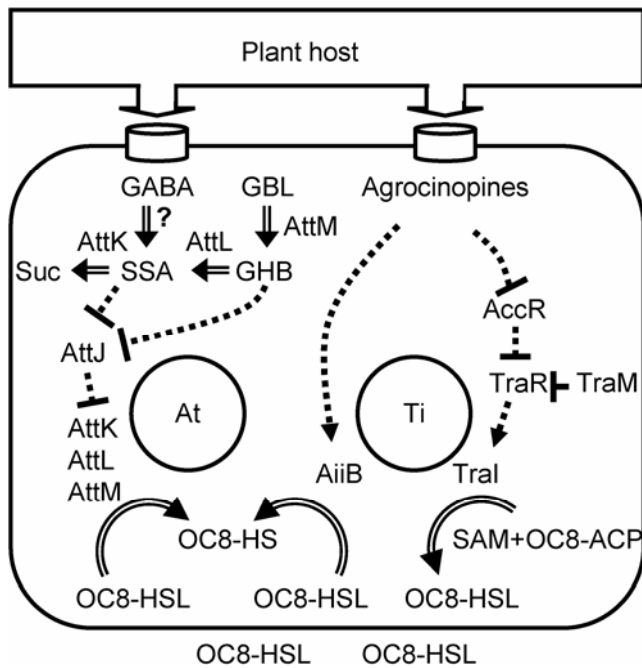
**Fig. 4.** Virulence assays on tobacco and tomato plants. Photos and graphs show greenhouse virulence assays ( $n = 16$ ) on **A**, tomato and **B**, tobacco plants that were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 wild type (wt) and its derivatives C58-110 (*attM*), C58-102 (*aiiB*), and C58-111 (*attM<sub>aiiB</sub>*). **C**, Graphs show greenhouse virulence assays ( $n = 8$ ) on tomato plants that were inoculated with *A. tumefaciens* C58 wt and C58-102 derivative (both harboring the pME6010 vector) and with C58-102 complemented with pMIR103 expressing lactonase AiiB. Bacterial genotypes showing statistical differences (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.01$ ) in their aggressiveness categories are noted by different letters (a, b, and c). All data are collected from two independent replicates.

mediates the degradation of OC8-HSL in wounded plant tissues (Fig. 2E), suggesting that the AttM lactonase may temporarily inactivate the QS signal after wounding of stem and tumor tissues. However, GABA, which participates in plant response to abiotic and biotic stresses (Shelp et al. 2006), is also accumulated at a high level in unwounded *A. tumefaciens*-induced tumors of tomato plants (Fig. 2C) and *Arabidopsis thaliana* (Deeken et al. 2006); however, the impact of the AttM lactonase on the expression of QS functions is weak (Table 1; Fig. 4). This observation was also reported by Khan and Farrand (2009). Three nonexclusive hypotheses may be proposed: i) the AttM-mediated inactivation of OC8-HSL would be balanced by a strongest synthesis of this signal in plant tumors; ii) the decrease of the competitiveness of *attM* defective mutant in plant tumors (Fig. 5) would contribute to underestimate the conjugation competence of this bacterial genotype; and iii) the GABA-controlled expression of *attKLM* in planta would be attenuated by another plant signal. The hypothesis of a mechanism that downregulates the GABA-mediated expression of *attKLM* operon in plant tumors is supported by the following observation: expression of *attKLM* was lower in the presence of tumor than stem tissues (Fig. 2D) while the level of GABA was higher in tumor than stem tissues (Fig. 2C).

In addition to its involvement in the inactivation of the QS signal, the lactonase AttM, together with AttK and AttL, contribute to assimilation of GBL and GHB as carbon sources (Carrier et al. 2004). Competition assays demonstrated that the *attM* gene was advantageous for the agrobacterial host in the tumor environment but neutral in the rhizosphere (Fig. 5). This feature reveals a selective advantage conferred by the *At* plasmid to agrobacteria in plant tumors and may participate in maintenance of the *attM* gene among *A. tumefaciens* populations. Remarkably, the *attKLM* operon is also present in the



**Fig. 5.** Competition assay in rhizosphere and tumor of tomato plants. Colonization of **A**, tomato rhizosphere and **B**, tumors by total cultivable bacteria (open squares) and agrobacteria (full squares) was expressed as CFU/g fresh weight of **A**, root or **B**, tumor. At each time, three independent samples were examined and standard deviation was lower than 10% of mean values. In the **C**, rhizosphere and **D**, tumors, the percentage of both competitors C58-107 (*attM<sup>+</sup>aiiB<sup>+</sup>*) (gray bars) and C58-110 (*attM<sup>-</sup>aiiB<sup>+</sup>*) (white bars) was calculated on at least 48 isolates per sample.



**Fig. 6.** Model for regulation of the synthesis and degradation of 3-oxo-octanoylhomoserine lactone (OC8-HSL) by plant signals.  $\gamma$ -Aminobutyrate (GABA) and agrocinopines penetrate into *Agrobacterium tumefaciens* cells via ABC-transporters (cylinders), while pathways for the transportation of GBL,  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB), and succinic semialdehyde (SSA) are still not known. The enzyme allowing conversion of GABA into SSA is also unknown in *A. tumefaciens*. Although agrocinopines are required for synthesis of OC8-HSL signals, they also contribute to trigger the expression of lactonase AiiB; the *attKLM* operon converts GBL, GHB, and SSA into succinate (Suc) that can enter into TCA cycle. The repressing activity of AttJ is modulated by SSA and GHB. Both of the lactonases AttM and AiiB would act as modulator of the level of OC8-HSL. The dotted and double arrows indicate regulatory pathways and enzyme reactions, respectively. OC8HS, 3-oxo-octanoyl-homoserine; SAM, S-adenosyl methionine.

nodule inducers *R. leguminosarum* biovar *viciae* 3841 (Young et al. 2006) and *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (Lee et al. 2008). In the case of *R. leguminosarum* 3841, the lactonase activity toward NAHL was experimentally confirmed when AttM-homolog was expressed in *E. coli* (Riaz et al. 2008). Both *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors (Deeken et al. 2006) (Fig. 3A) and N-fixing nodules (Miller et al. 1991; Prell et al. 2002; Vance and Heichel 1991) are GABA-rich plant environments. Therefore, byproducts of GABA metabolism, such as SSA, GHB, and GBL (Bouché and Fromm 2004) would accumulate in both nodules and tumors and would be assimilated by agrobacteria and rhizobia via *attKLM* operon; the precise level of GHB and GBL remains to be experimentally determined in both nodule and tumor tissues.

In conclusion, the biological roles of the *A. tumefaciens* lactonases AttM and AiiB are diverse. They appear to be fine modulators of QS-regulated functions and, thus, should be integrated in a regulation model of QS in *A. tumefaciens* C58 (Fig. 6). Whereas the TraI-mediated synthesis of OC8-HSL is controlled by a regulatory cascade (implicating AccR, TraR, and TraM) that is initiated by the T-DNA-encoded agrocinopines A and B, the inactivation of OC8-HSL is controlled by diverse signals, such as agrocinopines in the case of AiiB and stress-induced plant compounds, such as GABA, GHB, and salicylic acid, in the case of AttM. The combination of all these signals likely contributes to an optimization of the expression of virulence functions in *A. tumefaciens* C58 (Yuan et al. 2008). Additionally, AttM confers a selective advantage to *A. tumefaciens* in the tumor environment, a feature that is probably related to the assimilative function of the *attKLM* operon.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains, media, and chemicals.

Strains are listed in Table 2. *E. coli* cells were grown at 37°C in Luria-Bertani modified (LBm) medium, in which the NaCl concentration was 5 g/liter. *A. tumefaciens* strains were

**Table 2.** Bacterial strains and plasmids

Strains <sup>a</sup>	Relevant characteristics <sup>b</sup>	Source or reference
<i>E. coli</i>	supE44 $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17deoR recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan et al. 1983
<i>A. tumefaciens</i>		
C58	Wild type, containing Ti (nopaline/agrocinopines) and At plasmids, producing OC8-HSL	Laboratory collection
C58-C	C58 derivative, free of Ti plasmid, Rf <sup>r</sup>	This study
C58-00	C58 derivative, free of Ti and At plasmids, Rf <sup>r</sup> and Sm <sup>r</sup>	Laboratory collection
C58-102	C58 derivative, <i>aaiB::aphA</i> , Km <sup>r</sup>	This study
C58-105	C58 derivative, <i>aaiB::acc1</i> , Gm <sup>r</sup>	This study
C58-107	C58 derivative, <i>atu6148::acc1</i> , Gm <sup>r</sup>	This study
C58-110	C58 derivative, <i>attM::acc1</i> , Gm <sup>r</sup>	Chevrot et al. 2006
C58-111	C58-102 derivative, <i>attM::acc1 aaiB::aphA</i> , Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	This study
C58-115	C58 derivative, <i>traI::acc1</i> , Gm <sup>r</sup>	This study
C58-121	C58 derivative, <i>accR::acc1</i> , Gm <sup>r</sup>	This study
C58-127	C58 derivative, <i>aaiB::lacZ</i> fusion on Ti plasmid, Km <sup>r</sup>	This study
C58-132	C58-121 derivative, <i>aaiB::lacZ</i> fusion on Ti plasmid, Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	This study
K476	C58 derivative, <i>accA::Tn3HoHo1</i> , Cb <sup>r</sup>	Kim and Farrand 1997
NT1(pZLR4)	Harboring fusion <i>traG::lacZ</i> , OC8-HSL biosensor, Gm <sup>r</sup>	Piper et al. 1993
Plasmids		
pKm34S	Source of Km-cassette	Dennis and Zylstra 1998
pGm34S	Source of Gm-cassette	Dennis and Zylstra 1998
pKOK5	Source of Km- <i>lacZ</i> cassette, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	Kokotek et al. 1989
pME6010	Broad host-range vector, pVS1 derivative, low copy number, Tc <sup>r</sup>	Heeb et al. 2000
pME6031	Broad host-range vector, pVS1 derivative, low copy number, Tc <sup>r</sup>	Heeb et al. 2000
pMIR103	pME6010 expressing <i>aaiB</i>	Carlier et al. 2003
pMIR124	pME6031 harboring <i>traI::lacZ</i> fusion	This study
pMIR163	pME6031 harboring <i>orfA::lacZ</i> fusion	This study
pMIR122	pME6031 harboring <i>attK::lacZ</i> fusion	Carlier et al. 2004

<sup>a</sup> *E. coli* = *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and *A. tumefaciens* = *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives.

<sup>b</sup> Ti = tumor inducing; OC8-HSL = 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone; Rf<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Cb<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>, and Tc<sup>r</sup> = resistant to rifampicin, kanamycin, gentamycin, carbenicillin, ampicillin, and tetracycline, respectively.



routinely grown at 28°C in AB minimal medium (Chilton et al. 1974) supplemented with mannitol (0.2%), or in LBm or TY rich medium (Beringer 1974). When appropriate, antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 50 mg/liter; carbenicillin, 100 mg/liter; gentamycin, 20 mg/liter; kanamycin, 50 mg/liter; rifampicin, 100 mg/liter; and tetracycline, 10 mg/liter. All chemicals were from commercial sources, except opines that were synthesized in our laboratory or purified as described below. Agrocinosines A and B were extracted in H<sub>2</sub>O (3 ml/g of tissue) from 2 g (fresh weight) of *A. tumefaciens* C58-induced tumors on tomato stems. After centrifugation, the supernatant was lyophilized and dissolved in 1/10 the original volume of H<sub>2</sub>O. Crude extract was acidified by addition of 2 M acetic acid (20 mM final concentration) and submitted to high voltage paper electrophoresis (Whatman 3MM paper) in a formic-acetic acid buffer (Ellis and Murphy 1981) for 20 min at 65 V/cm. Silver nitrate staining (Tun-Garrido et al. 2003) was performed on external sections of the paper to visualize the agrocinosines. Electrophoretic mobilities (Em) were evaluated relative to Orange G (Em = 1.0) and xylene cyanol with fructose as the nonmigrating marker. Agrocinosines present in unstained strips of the paper were eluted with water, vacuum-concentrated, and dissolved in a final volume of 500 µl of water.

### Construction of mutants and plasmids.

The Km-cassette from p34S-Km (Dennis and Zylstra 1998) was cloned into pBS-SK harboring the 3' and 5' regions of the *aiiB* gene. The resulting plasmid, pMIR112, was electroporated into *A. tumefaciens* C58. Double crossovers were identified by carbenicillin sensitivity assays and verified by diagnostic PCR with appropriate primers. The resulting *aiiB::aphA* mutant was named C58-102. The double mutant *aiiB-attM* (C58-111) was obtained by electroporating the plasmid pMIR112 into the *attM::acc1* (C58-110) mutant (Chevrot et al. 2006). Following a procedure similar to that described above, the Gm-cassette from the p34S-Gm plasmid (Dennis and Zylstra 1998) was used to obtain the *aiiB::acc1* (C58-105), *atu6148::acc1* (C58-107), *tral::acc1* (C58-115), and *accR::acc1* (C58-121) mutants in *A. tumefaciens* C58.

To construct the *aiiB::lacZ* transcriptional fusion, the DNA fragment containing the 5' region of the *aiiB* gene was amplified (primers 5'-TCTTCCCTCTCATCGCGACC and 5'-GGAAA GAACGGAGATCGGCAA), then cloned into the pGEM-T easy vector, in which the promoterless *aph-lacZ* cassette of pKOK5 (Kokotek and Lotz 1989) was thereafter introduced. The resulting construction was directly electroporated into the *A. tumefaciens* C58 strain and its *accR* and *accA* derivatives to create strains with single crossover Campbell-type insertions. The pMIR124 and pMIR163 plasmids harboring the *tral::lacZ* and *orfA::lacZ* reporter fusions, respectively, were created by amplifying DNA fragments containing the predicted region of each promoter, ligating it into pGEM-Teasy, and then subcloning it into the pME6031 plasmid (Heeb et al. 2000). The promoterless *aphA-lacZ* cassette of pKOK5 vector (Kokotek et al. 1989) was fused downstream of each promoter. The plasmids were finally transferred into *A. tumefaciens* C58 strains by electroporation.

### β-Galactosidase assays, acyl-HSL detection, and quantification of GABA.

*A. tumefaciens* C58 derivatives carrying the *aiiB::lacZ* fusion were grown in AB medium for 20 h. Then, 250 µl of the different cultures were mixed with 500 µl of fresh AB medium, 250 µl of the different compounds to assay (final concentration 1 mM) in a 1-ml final volume, and incubated for 20 h until β-galactosidase activity was measured as described previously

(Carlier et al. 2004). Plant tissues were added at 1 g of fresh tissues per milliliter. Acyl-HSL detection was performed on TLC silica plates (Whatman, C18-reverse phase) as previously described (Shaw et al. 1997) using pure acyl-HSL as standards and the biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Cha et al. 1998). Acyl-HSL-degradation assays were performed by adding OC8-HSL (up to 200 nM) at the beginning of the culture, as previously described (Carlier et al. 2004). To quantify GABA, unwounded and wounded stems and tumors of tomato plants were immediately frozen in liquid nitrogen and extracted in aqueous methanol as previously described (Zhang and Bown 1997). Wounded tissues were generated by cutting 0.1-cm sections from tomato stems and then stored for 10 min at 25°C before being frozen. The composition of individual amino acids (including GABA) was determined by ion-exchange chromatography using the AminoTac JLC-500\_V amino acid analyzer (Diaz et al. 2005).

### Virulence assays.

In the greenhouse, virulence assays were conducted on stems of 8-week-old tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samson) and 4-week-old tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Dona). Each stem was incised (4 cm) with a scalpel and infected by approximately 10<sup>6</sup> CFU of *A. tumefaciens* C58 or its derivatives that were picked up from 48-h cultures on LBm agar plates. The number of tumors per incision was counted 5 weeks (tobacco) or 3 weeks (tomato) postinoculation. The aggressiveness of the strains was categorized into five classes: less than 5, from 5 to 14, 15 to 29, 30 to 50, or more than 50 tumors per infection site. Each virulence assay was performed in at least two independent experiments.

### Conjugation assays.

In vitro tomato plants were infected by various donor *A. tumefaciens* strains harboring an antibiotic resistance gene on their Ti plasmid. The *A. tumefaciens* C58-107 mutant in which a Gm-cassette was inserted into the transposase-encoding gene *atu6148* on Ti plasmid was used as a control. Tumors (2 weeks old) that appeared were infected by the C58-00 recipient strain. The plants were immediately transferred onto fresh MS/2 medium and incubated at 24°C for 2 weeks. Tumors ( $n \geq 9$ ) were crushed into sterile 0.8% NaCl solution and suspension dilutions were spotted onto LBm agar with the appropriate antibiotics for enumerating donors, recipients, and transconjugants. All transconjugants were verified by amplification of selected genetic markers.

For in vitro conjugation assay, donor (C58-107 and C58-105) and recipient (C58-00) strains were precultivated in AB medium in the absence of opines, then mixed at 1/1 ratio in AB medium (200 µl) supplemented with purified agrocinosines and incubated at 24°C. Four replicates were done. Suspension dilutions were spotted onto LBm agar with the appropriate antibiotics for enumerating donors, recipients, and transconjugants. Transconjugants were verified by amplification of selected genetic markers.

### Competition assays.

Competitions were performed in tumor and rhizosphere compartments of tomato plants (*L. esculentum* cv. Dona). In the case of competition in plant tumors, bacterial suspension densities of each competitor were adjusted in 0.8% NaCl, the suspensions mixed in equal ratio, and then inoculated onto LBm plates that were incubated at 28°C for 48 h. Those mixed cultures were used to infect 5-week-old plants as described above in virulence assay.

In the case of competition in the rhizosphere, the two competitors were mixed in equal ratio and a unique cell suspension



was used to inoculate a nonsterile soil mixture (Loire River sand and compost, 1:1, vol/vol) to obtain a cell number of  $10^4$  CFU/g of soil. Tomato seed that were preliminarily germinated on sterilized soil were transplanted into pots containing the inoculated soil.

At appropriate times, three independent samples (tumor or rhizosphere) were harvested, crushed, suspended, and diluted in 0.8% NaCl for spreading on appropriate medium for counting. Total bacteria were enumerated on TY medium (Beringer 1974), while the inoculated agrobacteria were enumerated on tellurite medium (Mougel et al. 2001) supplemented with gentamycin because all competitors harbor the same Gm<sup>r</sup>-cassette (*acc1*). The percentage of each competitor was estimated on at least 48 randomly chosen isolates that were individually identified by PCR amplification of specific markers.

### Isolation of rhizospheric *A. tumefaciens* (biovar1).

Disinfected seeds of tobacco and tomato lines were germinated in a soil mixture (1/1, vol/vol) consisting of sterile Loire River sand and nonsterile soil from the CNRS experimental field (Mérantaise, Gif-sur-Yvette), which was the source of soil bacteria. The pots (20 cm in diameter) were placed in the greenhouse under long-daylight conditions (16 h) at 17°C (night) and 24°C (day) and watered with tap water twice a day. Each pot contained three tobacco or tomato plants. Fifteen weeks after planting, three pots per condition (bare soil, tomato rhizosphere, and tobacco rhizosphere) were chosen for analysis of soil and rhizospheric samples. From each pot, 1 g of soil sample or root with adhering soil was resuspended in 10 ml of 0.8% sterile NaCl by very vigorous shaking for 3 min, and the resulting suspension was serially diluted. Appropriate dilutions were spread onto plates containing either the nonselective TY medium or the selective medium for agrobacteria amended with K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> (Mougel et al. 2001). After an incubation of 96 h at 24°C, total cultivable heterotrophic bacteria were counted as CFU.

### Natural occurrence of *attM* and *aiiB* genes.

The presence (+) or absence (–) of *attM* and *aiiB* genes was investigated by PCR amplification in several strains, including type strains belonging to *Agrobacterium* spp. as well as in the genomic draft of *A. vitis* S4 and *A. radiobacter* K84 (also referred as *R. rhizogenes* K84). Pairs of primers 5'-GCAACAGA TCCGCGTGGCCATTGG and 5'-TAATAATCGTCTGCGC ACCGTTG and 5'-GGCAGATTGCATGCCGACGC and 5'-T GAACCAGATCGCGTGACTT were used to amplify *attM* and *aiiB* genes, respectively, under standard PCR conditions as described by D'Angelo-Picard and associates (2005).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank X. Nesme (University of Lyon, France) for providing the *Agrobacterium* reference strains from all the genomic groups and to S. K. Farrand (University of Illinois, U.S.A.) for mutant *accA*, as well as for fruitful discussions. This work is supported by Centre national de la Recherche Scientifique (France).

### LITERATURE CITED

Beck von Bodman, S., Hayman, G. T., and Farrand, S. K. 1992. Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are co-ordinately regulated by a single repressor. *Biochemistry* 31:643-647.

Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.

Bouché N, and Fromm, H. 2004. GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9:110-115.

Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Latour, X., Fray, R., Dessaux, Y., and 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.

Carlier, A., Chevrot, R., Dessaux, Y., and 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.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., and Farrand, S. K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1119-1129.

Chai, Y., Tsai, C. C., Cho, H., and Winans, S. C. 2007. Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL and AttM catalytic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 189:3674-3679.

Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B. J., Ron, E., and Faure, D. 2006. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:7460-7464.

Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P., and 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.

D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., and Dessaux, Y. 2005. Diversity of N-acylhomoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7:1796-1808.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Eftova, M., Czirjak, T., Müller, T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T., and Hedrich, R. 2006. An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: A genome-wide approach. *Plant Cell* 18:3617-3634.

Dennis, J. J., and Zylstra, G. J. 1998. Plasposons: Modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2710-2715.

Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J. F., Wingler, A., and Masclaux-Daubresse, C. 2005. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* 138:898-908.

Ellis, J. G., and Murphy, P. J. 1981. Four new opines from crown gall tumours—their detection and properties. *Mol. Gen. Genet.* 181:36-43.

Escobar, M. A., and Dandekar, A. M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* 8:380-386.

Fuqua, C., and Winans, S. C. 1996. Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the traR gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol. Microbiol.* 20:1199-1210.

Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schneider, U., Kell, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., and Haas, D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:232-237.

Khan, S. R., and Farrand, S. K. 2009. The BlecC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative Transfer. *J. Bacteriol.* 191:1320-1329.

Kim, H., and Farrand, S. K. 1997. Characterization of the acc operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84. *J. Bacteriol.* 179:7559-7572.

Kokotek, W., and Lotz, W. 1989. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84:467-471.

Lee, K. B., De Backer, P., Aono, T., Liu, C. T., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D. M., Najjar, F. Z., Wiley, G. B., Roe, B., Binnewies, T. T., Ussery, D. W., D'Haese, W., Herder, J. D., Gevers, D., Vereecke, D., Holsters, M., and Oyaizu, H. 2008. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics* 9:271.

Li, P. L., and Farrand, S. K. 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J. Bacteriol.* 182:179-188.

Liu, D., Thomas, P. W., Momb, J., Hoang, Q. Q., Petsko, G. A., Ringe, D., and Fast, W. 2007. Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry* 46:11789-11799.

Luo, Z. Q., and Farrand, S. K. 2003. In situ activation of the quorum-sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acyl-homoserine lactone ligands: Kinetics and consequences. *J. Bacteriol.* 185:5665-5672.

Luo, Z. Q., Qin, Y., and Farrand, S. K. 2000. The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J. Biol. Chem.* 275:7713-7722.

- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G., and 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.
- Miller, R. W., McRae, D. G., and Joy, K. 1991. Glutamate and gamma-aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:37-45.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., and Défago, G. 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: A preventive and curative biological control mechanism. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 45:71-81.
- Mougel, C., Cournoyer, B., and Nesme, X. 2001. Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:65-74.
- Pappas, K. M., and Winans, S. C. 2003. A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol. Microbiol.* 48:1059-1073.
- Piper, K. R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S. K. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 362:448-450.
- Piper, K. R., Beck von Bodman, S., Hwang, I., and Farrand, S. K. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: Controlling quorum-sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 32:1077-1089.
- Popoff, M. Y., Kersters, K., Kiredjin, M., Miras, I., and Coynault, C. 1984. Taxonomic positions of *Agrobacterium* strains of hospital origin. *Ann. Microbiol. (Paris)* 135:427-442.
- Prell, J., Boesten, B., Poole, P., and Priefer, U. B. 2002. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* 148:615-623.
- Qin, Y., Su, S., and Farrand, S. K. 2007. Molecular basis of transcriptional antiactivation. TraM disrupts the TraR-DNA complex through stepwise interactions. *J. Biol. Chem.* 282:19979-19991.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. 2008. A metagenomic analysis of rhizospheric bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ. Microbiol.* 10:560-570.
- Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J. P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F., and Villarroel, R. 1979. Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 204:251-266.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogt, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A., and Langebartels, C. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29:909-918.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Rinchart, K. L., and 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.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., and Faure, D. 2006. Extracellular gamma-aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms. *Plant Physiol.* 142:1350-1352.
- Swiderska, A., Berndtson, A. K., Cha, M. R., Li, L., Beaudoin, G. M. J., III, Zhu, J., and Fuqua, C. 2001. Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. *J. Biol. Chem.* 276:49449-49458.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V., and 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.
- Vance, C. P., and Heichel, G. H. 1991. Carbon in N<sub>2</sub> fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:373-392.
- Wang, C., Zhang, H. B., Wang, L. H., and Zhang, L. H. 2006. Succinic semialdehyde couples stress responses to quorum-sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 62:45-56.
- Young, J. P., Crossman, L. C., Johnston, A. W., Thomson, N. R., Ghazoul, Z. F., Hull, K. H., Wexler, M., Curson, A. R., Todd, J. D., Poole, P. S., Mauchline, T. H., East, A. K., Quail, M. A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., and Parkhill, J. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 7:R34.
- Yuan, Z. C., Edlind, M. P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L. M., Wise, A. A., Ronzone, E., Binns, A. N., Kerr, K., and Nester, E. W. 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.
- Yuan, Z. C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K. F., and Nester, E. W. 2008. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signals salicylic acid, indole-3-acetic acid, and gamma-amino butyric acid reveals signaling crosstalk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cell Microbiol.* 10:2339-2354.
- Zhang, G., and Bown, A. W. 1997. The rapid determination of gamma-aminobutyric acid. *Phytochemistry* 44:1007-1009.
- Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A., and Tate, M. E. 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl homoserine lactones. *Nature* 362:446-448.
- Zhang, H. B., Wang, L. H., and 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, H. B., Wang, C., and Zhang, L. H. 2004. The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* 52:1389-1401.



## ANNEXE 2

Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in  
*Agrobacterium tumefaciens*

Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B.,  
Morera, S., and Faure, D.

(2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14587-14592.



# Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*

E. Haudecoeur<sup>a</sup>, S. Planamente<sup>a,b</sup>, A. Cirou<sup>a</sup>, M. Tannières<sup>a</sup>, B. J. Shelp<sup>c</sup>, S. Moréra<sup>b</sup>, and D. Faure<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette 91 198, France; <sup>b</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Gif-sur-Yvette 91 198, France; and <sup>c</sup>Department of Plant Agriculture, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1

Edited by Eugene W. Nester, University of Washington, Seattle, WA, and approved July 7, 2009 (received for review August 13, 2008)

Plants accumulate free L-proline (Pro) in response to abiotic stresses (drought and salinity) and presence of bacterial pathogens, including the tumor-inducing bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. However, the function of Pro accumulation in host-pathogen interaction is still unclear. Here, we demonstrated that Pro antagonizes plant GABA-defense in the *A. tumefaciens* C58-induced tumor by interfering with the import of GABA and consequently the GABA-induced degradation of the bacterial quorum-sensing signal, 3-oxo-octanoylhomo-serine lactone. We identified a bacterial receptor Atu2422, which is implicated in the uptake of GABA and Pro, suggesting that Pro acts as a natural antagonist of GABA-signaling. The Atu2422 amino acid sequence contains a Venus flytrap domain that is required for trapping GABA in human GABA<sub>B</sub> receptors. A constructed *atu2422* mutant was more virulent than the wild type bacterium; moreover, transgenic plants with a low level of Pro exhibited less severe tumor symptoms than did their wild-type parents, revealing a crucial role for Venus flytrap GABA-receptor and relative abundance of GABA and Pro in host-pathogen interaction.

plant defense | virulence | plant tumor | lactonase

The bacterial pathogen *Agrobacterium tumefaciens* genetically engineers the plant host by transferring a piece of DNA (the T-DNA) from its tumor-inducing (Ti) plasmid to the nuclear genome of plants. Proliferation of the transformed plant cells results in formation of a tumor (crown gall disease), which is colonized by the pathogen (a review in ref. 1). In addition, expression of the T-DNA redirects the metabolism of plant cells toward the production of compounds called opines, which are used by the pathogen as nutrients or signals to control the expression of some virulence functions. In bacterial cells, the opines stimulate the synthesis of a quorum-sensing (QS) signal, 3-oxo-octanoylhomo-serine lactone (OC8HSL) (2), which in turn activates the horizontal transfer and amplification of the copy number of the Ti plasmid (3), thereby increasing the aggressiveness of *A. tumefaciens* populations and contributing to the dissemination of the Ti plasmid.

In response to *A. tumefaciens* infection, plants activate a complex program of defense (4–7), which includes the synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). In *A. tumefaciens*, GABA promotes degradation of the OC8HSL signal by the lactonase AttM, thereby attenuating expression of the OC8HSL-dependent functions (8, 9). Paradoxically, tumors simultaneously accumulate opines and GABA which induce two opposite functions in *A. tumefaciens* that are the synthesis and degradation of the OC8HSL signal, respectively. Because the plant tumor is a unique ecological niche in which *A. tumefaciens* expresses OC8HSL-dependent functions including horizontal transfer of the Ti plasmid (2), it can be hypothesized that the bacterial pathogen has evolved mechanisms to escape plant GABA-defense.

Here, we report that Pro antagonizes the GABA-induced degradation of OC8HSL. Therefore Pro, which accumulates in the tumor (10), could be used by the pathogen to by-pass the

plant GABA-defense. Moreover, we demonstrate that the mechanism for perception of GABA and Pro involves a bacterial receptor containing a Venus flytrap domain which is also required for GABA sensing by the human GABA<sub>B</sub>-receptor (11). This research highlights that the anti-GABA paradigm, which permits the development of medicines against neurologic diseases, is already exploited by a tumor-inducing pathogen to escape host GABA-defense.

## Results

**Free Proline and Valine Antagonize the AttM-Mediated Degradation of OC8HSL in the Presence of GABA.** We screened amino acids and organic acids (1 mM) for their capacity to reduce expression of an *attK-lacZ* fusion which harbors the promoter for the *attKLM* operon of *A. tumefaciens* C58 (12), in the presence of GABA (0.1 mM). Among the molecules tested, that include opines, a 10-fold excess of proline (Pro) and valine (Val) was sufficient to antagonize the GABA-dependent expression of the AttM lactonase, as well as the degradation of the OC8HSL signal (Fig. 1A). Under those culture conditions, the addition of Pro or Val (1 mM) did not significantly affect bacterial cell density (Fig. 1A). Because the import of GABA is required for expression of *attM* (9), the direct effect of Pro or Val was investigated. Both Pro and Val abolished transport of GABA in *A. tumefaciens* C58 cells (Fig. 1B).

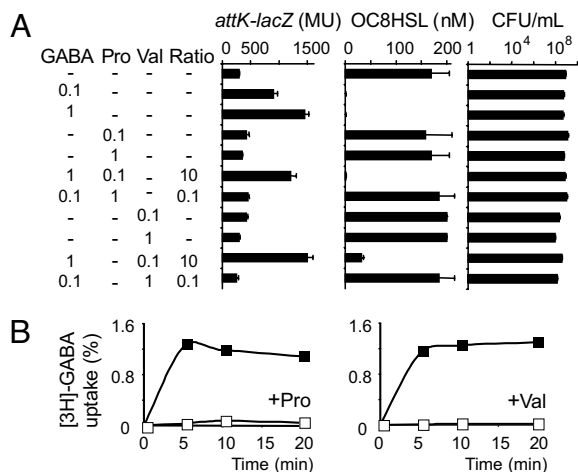
**Variation of GABA/Pro Ratio in Plant Hosts.** Wounding, which is a prerequisite event for the emergence of a tumor, had no effect on Val and Pro concentrations, but stimulated the accumulation of GABA (Fig. 2A). Tumor tissues also accumulated GABA as a part of the plant response to bacterial infection (7, 9). High GABA/Val ratios in healthy (0.6), wounded (2.6) and tumor (0.4) tissues disqualified Val as a bona fide anti-GABA compound *in planta*. In contrast, the GABA/Pro ratio in tumor tissues was 0.1, a value similar to that permitting effective anti-GABA activity *in vitro* (Fig. 1A). Asn, Asp, Gln, Glu, and Pro were the most abundant amino acids in the plant tumor (Fig. 2B); together, they represented 84% of the total free amino acids. None but Pro significantly affected the uptake of GABA, nor the expression of the GABA-regulated operon *attKLM* (Fig. 2B). Pro, which accumulates in plant tumor (Fig. 2A), would therefore be the most probable natural antagonist of GABA-signaling in the bacterial pathogen *A. tumefaciens* C58. To test this hypothesis, expression of the GABA-induced operon *attKLM* was compared in the presence of stem or tumor tissues, which release GABA (up to 0.08 mM) and Pro (up to 0.84 mM)

Author contributions: D.F. designed research; E.H., S.P., A.C., M.T., and D.F. performed research; E.H., S.P., A.C., M.T., B.J.S., S.M., and D.F. analyzed data; and E.H., B.J.S., S.M., and D.F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at: Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, Avenue de la Terrasse, 91 198 Gif-sur-Yvette, France. E-mail: faure@isv.cnrs-gif.fr.

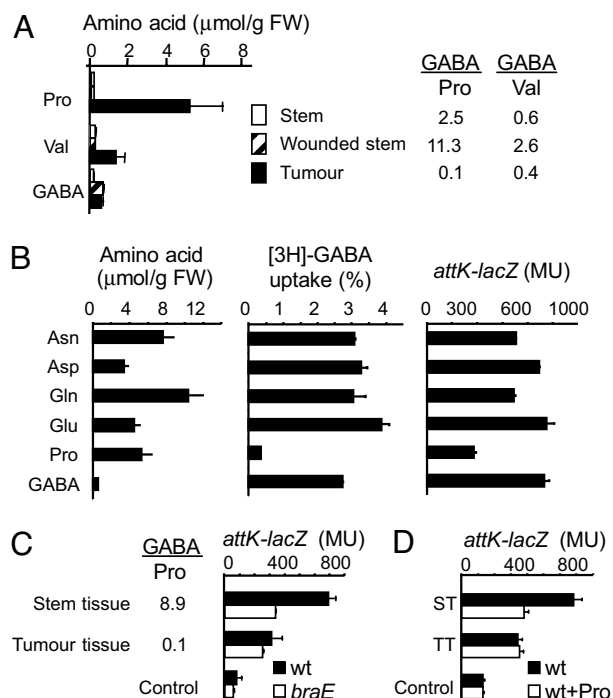


**Fig. 1.** Effect of proline and valine on the GABA-dependent expression of AttM in *A. tumefaciens*. (A) Expression of *attK-lacZ* fusion, OC8HSL concentration (added at 200 nM at the beginning of the culture) and bacterial densities (CFU/mL) in cultures of *A. tumefaciens* C58 supplemented with GABA, Pro, and/or Val. (B) Uptake of radiolabeled GABA (% of total available) in *A. tumefaciens* C58 cells in the absence (closed symbol) or presence (open symbol) of Pro (left graph) or Val (right graph) antagonists (1 mM).

at different ratios in the culture medium. The results indicate that high expression of the *attK-lacZ* fusion in the wild-type *A. tumefaciens* C58 was correlated with a high GABA/Pro ratio (Fig. 2C). Moreover, in the presence of stem tissues, *attK-lacZ* expression was reduced by addition of Pro (Fig. 2D) and in the *braE* mutant (Fig. 2C), which is defective for the main route of GABA uptake (9).

**The Receptor Atu2422 Is Required for Import of GABA, and Belongs to Venus Flytrap Family.** The ABC-transporter Bra belongs to a subfamily of ABC-transporters that requires a periplasmic solute binding protein (SBP) for trapping and accompanying the transported compounds to the channel (13). A mutation in the SBP-encoding gene *atu2422*, which is located downstream of the *braDEFG* operon, was constructed. Import of GABA (Fig. 3A), growth in the presence of GABA as a sole nitrogen source, GABA-dependent expression of lactonase AttM and degradation of the OC8HSL signal (Fig. 3B) were abolished in the *atu2422* and *braE* mutants. By contrast, those phenotypes were not affected in *A. tumefaciens* mutants defective for other putative SBPs, namely Atu4519, Atu5531, and Atu2276, which have high amino acid sequence similarity to Atu2422 (from 56% to 79%). The receptor Atu2422 is therefore strictly required for GABA signaling pathway in *A. tumefaciens* C58. Atu2422 has significant sequence identity (40%) with SBPs such as the Leu-Binding Protein and the Leu-Ile-Val-Binding Protein of *Escherichia coli*. Their three-dimensional structure (14, 15) revealed a bilobate domain that is called the Venus flytrap by analogy with the carnivorous plants. Common residues involved in ligand binding by bacterial Venus flytrap domain (16) are conserved in Atu2422. Moreover, our preliminary X-ray data analysis of Atu2422 protein confirmed a Venus flytrap fold (17).

**By-Products of GABA Bypass Atu2422 for Stimulating Expression of *attKLM* Operon.** GABA may be converted by plant enzymes into  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) with succinic semialdehyde (SSA) as a toxic intermediate (18, 19). A nonenzymatic conversion of GHB into  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) may occur at acidic pH. We observed that import of GHB (Fig. 3C) and expression of lactonase AttM in the presence of SSA, GHB, and GBL (Fig. 3D) was similar in the wild-type strain and the *atu2422* and *braE*

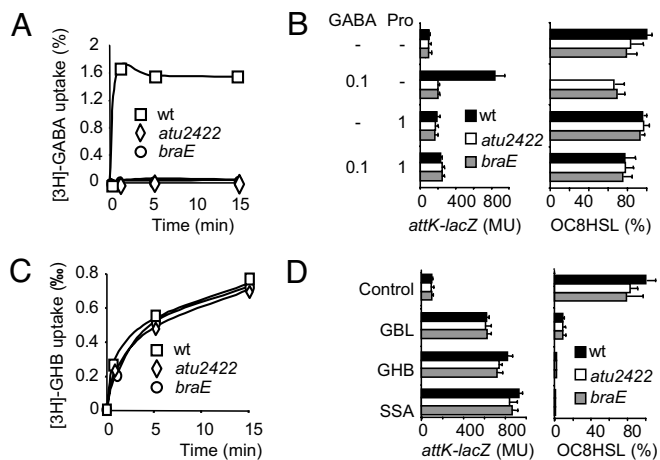


**Fig. 2.** Variation of GABA/Pro ratio in plant host. (A) level of GABA, Pro and Val in stem and *A. tumefaciens* C58-induced tumor of tomato plant. (B) Level of the most abundant amino acids in the same plant tumors, as well as their effect (at 1 mM) on uptake of radiolabeled GABA (% of total available) and expression of *attK-lacZ* fusion ( $\beta$ -gal activity in Miller units) in the presence of GABA (0.1 mM). (C) Ratio of GABA and Pro released in liquid medium by stem and tumor slices of tomato (0.25 g/mL) after 20 h. (C and D) Expression of the *attK-lacZ* transcriptional fusion ( $\beta$ -gal activity in Miller units) in cultures of *A. tumefaciens* C58 and its *braE* derivative after 20 h of growth in AB-medium supplemented with slices of stem (ST) and tumor tissues (TT) of tomato plant (C), and in the absence or presence of additional Pro at 5 mM (D).

mutants, suggesting these compounds use other carrier(s) to enter into the bacterial cells. These alternative pathways may explain residual expression of the *attKLM* operon in the *braE* mutant when challenged with tumor and stem tissues (Fig. 2C). Moreover, addition of Pro did not affect expression of *attKLM* operon in the presence of by-products of GABA suggesting that Pro would specifically act on GABA-signaling pathway.

**The Receptor Atu2422 and Transporter Bra Contribute to the Import of Pro.** Transport of Pro is affected in the *atu2422* and *braE* mutants (Fig. 4A), revealing that the Atu2422/Bra system may transport both GABA and Pro. Pro would therefore act as a competitive antagonist of GABA via the Atu2422/Bra system. The Bra ortholog in *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 is required for uptake of a broad spectrum of amino acids including GABA, Ala, Arg, Glu, and Leu (13). In contrast, transport of Glu (Fig. 4B), Ala, Arg, or Leu was not affected in *braE*, *atu2422* (ortholog of *rl3745*), and *atu2276* (ortholog of *rl3540*) mutants of *A. tumefaciens* C58. Moreover, the addition of GABA and Pro at a 100-fold excess had no effect on transport of Glu (Fig. 4B), Ala, Arg, or Leu, suggesting that *A. tumefaciens* expresses other dedicated transporters for these amino acids. To test this hypothesis we constructed a derivative of *A. tumefaciens* C58 in which the operon encoding the general amino acid ABC-transporter Aap (13) is mutated. The *aap* mutant retained only 20% of the capacity for Glu uptake in the wild type (Fig. 4C), and 75% of that for Arg and Leu, whereas GABA, Pro and Ala uptake was unaffected. Thus, the ABC-transporter Aap of *A.*

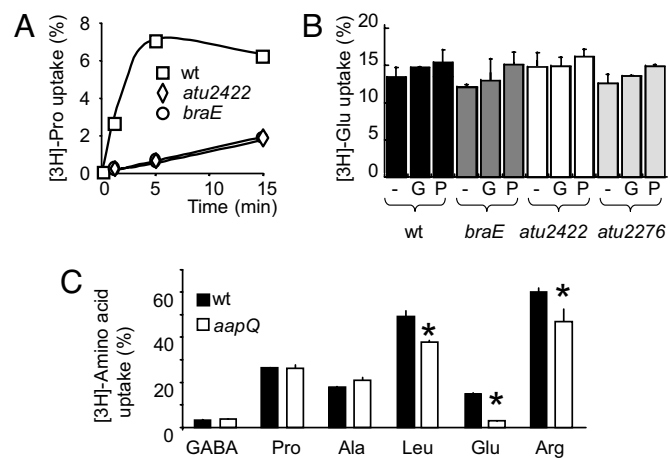




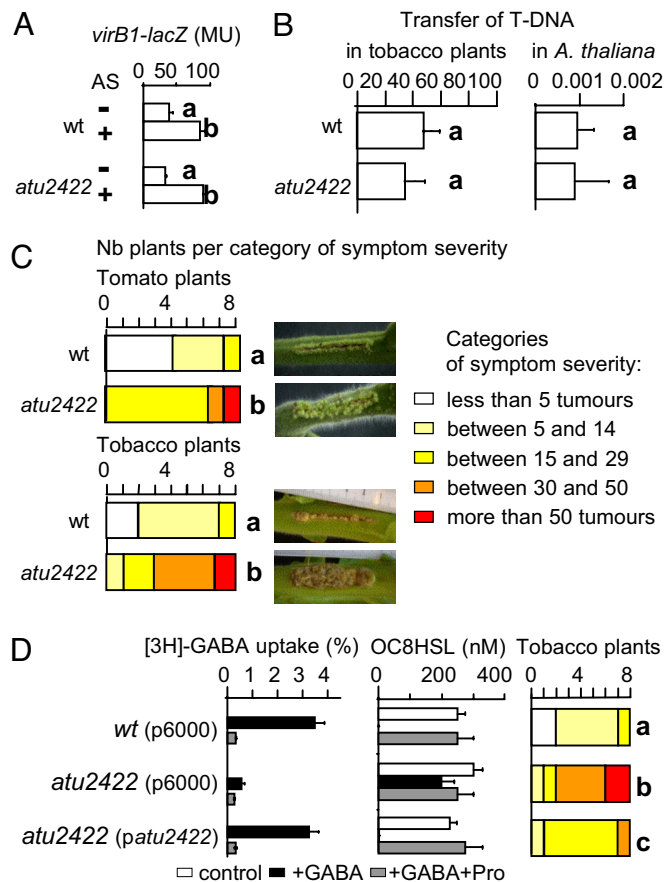
**Fig. 3.** The Venus-Flytrap receptor *Atu2422* is required for GABA-signaling pathway. (A and C) Uptake of radiolabeled GABA and GHB (% of total available) in cultures of *A. tumefaciens* C58, and its mutants *atu2422* and *braE*. (B and D) Expression of the *attK-lacZ* fusion ( $\beta$ -gal activity in Miller units) and OC8HSL concentration (added at 200 nM) in cultures of *A. tumefaciens* C58 wild type, *atu2422* and *braE* mutants, grown in AB-medium supplemented with GABA, GBL, GHB, SSA (0.1 mM), and/or Pro (1 mM). Experiments were done in triplicate.

*tumefaciens* C58 is the major transporter of Glu, which is the main precursor of GABA in plants.

**Involvement of the GABA-VFT-Receptor *Atu2422* in Virulence.** The mutation *atu2422* affected neither the expression of *virB-lacZ* fusion in the presence of acetosyringone (Fig. 5A), nor the transfer of T-DNA in tomato and tobacco plants, nor T-DNA integration in *A. thaliana* under the conditions tested (Fig. 5B). In contrast, a higher number of emerging tumors was observed in incisions infected by the *atu2422* mutant than in that infected by wild type strain C58 (Fig. 5C). In a complemented *atu2422* mutant, the transport of GABA, the GABA-induced degradation of OC8HSL and the antagonist activity of Pro were restored (Fig. 5D). Moreover, a decrease of plant symptoms was observed in the complemented mutant compared with the *atu2422* mutant



**Fig. 4.** The receptor *Atu2422* is involved in transport of Pro. Uptake (% of total available) of radiolabeled compounds, Pro (A), Glu (B), GABA, Pro, Ala, Leu, Glu, and Arg (C), in cells of *A. tumefaciens* C58, and its derivatives *atu2422*, *atu2276*, *braE*, and *aapQ*. In B, uptake of Glu was measured in the absence (-) or presence of GABA (G) or Pro (P) at 1 mM. In C, asterisk indicates a significant decrease in amino acid uptake by mutant *aapQ* (Student's t test;  $P < 0.01$ ).

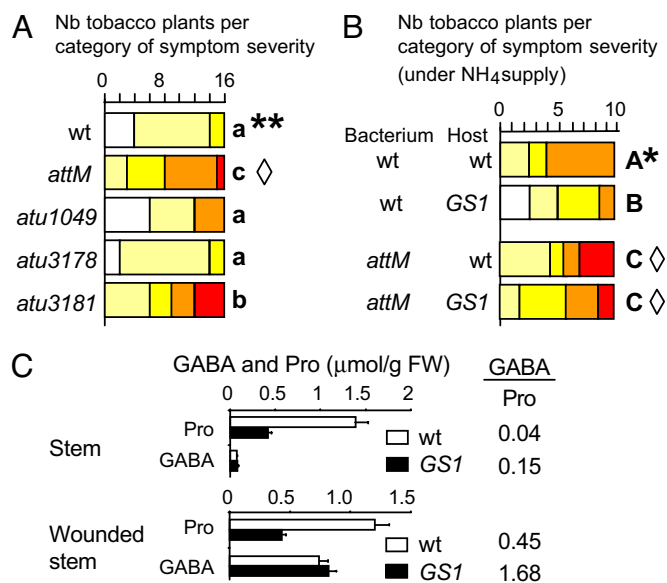


**Fig. 5.** Involvement of *Atu2422* in virulence. (A) Expression of the *virB1-lacZ* fusion ( $\beta$ -gal activity in Miller units) in the presence (+) and absence (-) of acetosyringone (AS) at 100  $\mu$ M. (B) T-DNA transfer in tobacco plant 2-dpi (GUS-expressing tissue in % of surface of disks collected from infiltrated leaves) and *A. thaliana* (number of transformed seeds/total number of infected seeds) infected by *A. tumefaciens* C58 and its *atu2422* derivative harbouring pCAMBIA3301. (C and D) *A. tumefaciens* C58 and *atu2422* mutant (C) harboring vector pME6000 or a pME6000-derivative expressing *atu2422* gene (D) were used for measuring virulence symptoms (number of emerging tumors) on infected plant hosts. Bacterial genotypes showing statistical differences (Student or Kruskal-wallis test;  $P < 0.01$ ) in their aggressiveness categories are noted by different letters. (D) Uptake of radiolabeled GABA in the presence or absence of Pro (1 mM), and OC8HSL concentration in presence or absence of GABA (0.1 mM) and Pro (1 mM).

harboring the empty vector pME6000 (Fig. 5D), suggesting that the assimilation of GABA and/or GABA-regulated functions can modulate the emergence of tumors.

**Involvement of GABA-Regulated Genes in Virulence.** We investigated the involvement in virulence of GABA-regulated genes previously identified as up-regulated (*atu5139* = *attM*) and down-regulated (*atu3181*, *atu1049*, and *atu3178*) by comparative transcriptomics (20). Appropriate mutants were used for performing the infection assay on tobacco plants. We previously reported (9) that fresh weight of the tumors induced by *A. tumefaciens* C58 wild-type or mutant *attM* on tobacco plants was similar ( $0.7 \pm 0.4$  g vs.  $0.7 \pm 0.3$  g, respectively). In this article, the method for measuring virulence symptoms on host plant was refined (i.e., measurement of the number of emerging tumors instead of the weight of all tumors at infection site) according to a procedure published by Pappas and Winans (3). The refined method was used in all virulence assays shown in Figs. 5 and 6. Among the tested mutants *attM*, *atu3181*, *atu1049*, and *atu3178*, only *attM* and *atu3181* derivatives were more





**Fig. 6.** Involvement of GABA-regulated genes in virulence. (A) Aggressiveness of *A. tumefaciens* C58 and its derivatives *attM*, *atu1049*, *atu3178*, and *atu3181* derivatives on tobacco plants. (B) Aggressiveness of *A. tumefaciens* C58 and *attM* mutant on wild-type and *GS1* line of tobacco plants supplied with NH<sub>4</sub>. Categories of symptom severity are the same as in Fig. 5. Bacterial genotypes showing statistical differences (Kruskal-wallis test;  $P < 0.01$ ) in their aggressiveness categories are noted by different letters (a–c, A–C). In A and B, asterisks indicate a statistical difference in the severity of symptoms caused by *A. tumefaciens* C58 on wild-type tobacco plants supplied with water or NH<sub>4</sub> solution; diamonds indicate no statistical difference when symptoms were caused by the *attM* mutant on wild-type and *GS1* tobacco plants supplied with water or NH<sub>4</sub> solution. All data were collected from two independent replicates. (C) Level of GABA and Pro in wild type and *GS1* line of tobacco plants under NH<sub>4</sub> supply.

virulent than the wild-type strain (Fig. 6A), exemplifying the involvement of GABA-regulated functions in the control of tumor emergence. This phenotype observed on tobacco plants was confirmed on tomato plants.

**The Emergence of Tumors Is Attenuated in a Tobacco Transgenic Line with Reduced Pro Accumulation.** In all of the above plant assays (Figs. 5 and 6A), the plants were grown on compost and were automatically supplied with water. According to a previous report (21), the accumulation of free Pro in stem tissues could be stimulated by growing plants on sand with an ammonium supply (5 mM). Under this growth condition, a 10-fold increase of Pro in the tobacco stem (0.16 vs. 1.5 μmol/g FW) was observed. However, because cytosolic glutamine synthetase *GS1* is required for Pro accumulation in stem (21), the level of Pro was reduced in an antisense *GS1* tobacco line (Fig. 6C). Using both physiologic (with or without ammonium) and genetic (wild-type vs. *GS1* lines) approaches, we were able to modulate Pro level (therefore GABA/Pro ratio) in tobacco plants and compared their virulence symptoms induced by *A. tumefaciens*.

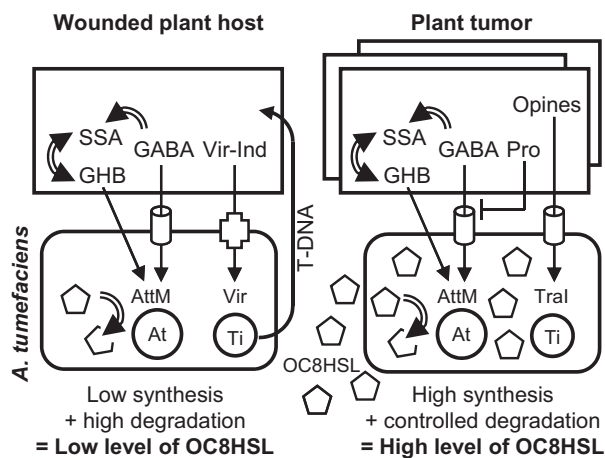
Symptoms induced by *A. tumefaciens* C58 wild type were more severe (columns with asterisks in Fig. 6A and B) on tobacco plants with high (with NH<sub>4</sub> supply) levels of Pro than on those with a low level. Moreover, wild-type *A. tumefaciens* C58 induced fewer symptoms on the *GS1* line than on the wild-type line (columns with letters A and B in Fig. 6B), suggesting the involvement of Pro level in tumor emergence. Because lactonase *AttM* is regulated by GABA/Pro ratio (Fig. 1A) and appears to contribute to virulence symptoms (Fig. 6A), we hypothesized the involvement of *AttM* in the Pro-dependent variation of the observed plant symptoms. This hypothesis predicts that varying the Pro concentration in the plant

host should not affect virulence symptoms caused by an *attM* mutant. Comparable symptoms were indeed observed on wild type plants (with or without ammonium) and *GS1* derivatives (columns with a diamond in Fig. 6A and B) inoculated by a *attM* mutant, revealing the involvement of lactonase *AttM* in the modulation of plant symptoms under ammonium supply.

## Discussion

This study reveals that GABA and Pro play opposite roles in the virulence of *A. tumefaciens* C58. A high GABA concentration in the plant host decreases the number of emerging tumors (9), whereas a high Pro concentration enhances tumor emergence (Fig. 6). Pro level is directly correlated to the nature of the nitrogen source assimilated by the plants (21). Therefore, an immediate agronomic implication of this work is that ammonium-containing nutrient solutions, which stimulate a decrease of the GABA/Pro ratio in the host plants, could increase their sensitivity to *A. tumefaciens* C58. However, Pro is proposed to participate in the defense response of the host plant challenged by bacterial pathogens: accumulation of Pro is induced by reactive oxygen species, depends upon the plant signal salicylic acid, and contributes to the hypersensitive response and cell death of infected tissues (22, 23). In particular, Pro steadily accumulates in the *A. tumefaciens*-induced plant tumor (7, 10), wherein it also plays a role in the protection of plant tissues from desiccation (10). One could not exclude a direct contribution of the pathogen to Pro accumulation in the plant tumor, because the Ti plasmid of *A. tumefaciens* C58 encodes an ornithine cyclodeaminase that releases Pro from ornithine, a by-product of the most abundant opine, nopaline (24). Other Ti plasmids encode ornithine cyclodeaminase and proline formation (25). Remarkably, in *A. rhizogenes*, the ornithine cyclodeaminase encoding gene, *rolD*, is localized in the T-DNA (26); this oncogene contributes to virulence of the pathogen by an unknown mechanism (27). Through manipulation of Pro synthesis or utilization of the stress-induced accumulation of Pro, *A. tumefaciens*, and *A. rhizogenes* pathogens should be able to by-pass a part of the plant defense response and optimize the expression of their virulence factors.

The mechanism by which Pro antagonizes GABA-signaling in *A. tumefaciens* C58 was discovered. Pro acts as a competitive antagonist of GABA import by the *Atu2422*-Bra ABC-transporter (Figs. 1, 3, and 4), thereby affecting the expression of GABA-regulated functions, such as the degradation of QS-signal OC8HSL by the lactonase *AttM* (Figs. 1 and 2). In *A. tumefaciens* C58, QS controls horizontal transfer (by conjugation) and copy number of Ti plasmid. An increase in the number of emerging tumors is correlated with overaccumulation of the QS-signal OC8HSL and amplification of Ti-plasmid copy-number (3, 9, 28), suggesting that severity of plant symptoms may in part be modulated by QS. Because GABA-receptor *Atu2422* plays a critical role in the expression of the lactonase *AttM*, its implication in the *A. tumefaciens*-plant host interaction was investigated using several virulence assays. The expression of *vir* genes and the transfer of T-DNA to different hosts was not affected in an *atu2422* mutant (Fig. 5A and B), confirming that the GABA-signaling pathway and *vir*-signaling pathway are independent (9). However, the bacterial GABA receptor (Fig. 5C and D) and consequently GABA-regulated functions, including *AttM*-mediated degradation of the QS signal (Fig. 6A and B), play a role in the emergence of plant tumors. The mechanism by which QS may modulate plant symptoms remains to be investigated. Furthermore, this work offers one clue for solving the paradoxical capability of *A. tumefaciens* C58 to transfer its Ti plasmid in a QS-dependent manner even in the presence of the GABA-up-regulated lactonase *AttM* (28, 29). Indeed, the effect of *AttM* on the QS-dependent conjugation of Ti plasmid was observed in young tumors with low level of Pro, but the role of *AttM* was weak in old tumors with elevated concentration of Pro. A model summarizing the role of plant signals in regulation of the QS-pathway is proposed (Fig. 7).



**Fig. 7.** Control of the AttM-mediated inactivation of QS-signal in *A. tumefaciens* C58. During infection (left part), phenolics (Vir-Ind) activate the expression of virulence functions (Vir) via the VirA/G two-component system, thereby permitting the transfer of T-DNA from the Ti plasmid of *A. tumefaciens* to the plant host. Concomitantly, plant GABA is imported via the Atu2422/Bra system, thereby stimulating the expression of lactonase AttM (encoded by At plasmid) and allowing inactivation of the QS-signal (OC8HSL). In the tumor (right part), opines stimulate the synthesis of OC8HSL by Tral, whereas Pro moderates the GABA-dependent expression of the lactonase AttM, thereby permitting expression of QS-regulated functions, including the transfer of Ti plasmid by conjugation. Residual expression of AttM is probable in the presence of signal salicylic acid (4) and GABA-derivatives such as GHB (12), and in young tumor when Pro level is weak (10). Opine-dependent regulation of the OC8HSL-lactonase AiiB (28) is not shown. Simple and stopped arrows represent regulatory pathways, whereas double-line arrows, cylinders, cross, and pentagons represent enzymatic reactions, bacterial ABC-transporters, VirA/G system, and OC8HSL, respectively.

The GABA-receptor Atu2422 of *A. tumefaciens* C58 exhibits a Venus Flytrap fold (17), which is also essential for perception of GABA by other bacteria, such as *R. leguminosarum* (13), and by several eukaryotic receptors, including GABA<sub>B</sub> in human brain and GrIE in the amoeba *Dictyostelium discoideum* (11, 30). Thus, the Venus Flytrap domain represents a common fold for sensing exogenous GABA in both bacteria and eukaryotes. In eukaryotic GABA-VFT receptors, sensitivity to a strict or wide range of amino acids results in crucial consequences for their biological role in vivo (11, 30). In *A. tumefaciens* C58, the selectivity of the Atu2422-Bra system (Fig. 4) could reveal an evolutionary innovation implicating Pro as a natural antagonist of GABA to modulate the QS-pathway and escape plant GABA-defense in the plant tumor.

## Methods

**Bacterial Strains and Culture Conditions.** The *A. tumefaciens* strains used in this work were derivatives of *A. tumefaciens* C58. The mutants *atu1049::acc1*, *atu2422::acc1*, *atu2276::aphA*, *atu3178::acc1*, *atu3181::aphA*, *atu4519::aphA*, *atu5531::acc1*, *aapQ::acc1*, and *braE::aphA* were constructed by inserting the Gm-cassette (*acc1*) or *K<sub>m</sub>*-cassette (*aphA*) within the amplified genes (31). The mutated alleles were introduced into *Agrobacterium* by electroporation as previously described (9) and verified by PCR and sequencing. *A. tumefaciens* C58 and its derivatives were cultivated at 30°C in *Agrobacterium* broth (AB) medium (32) in the presence of mannitol and ammonium chloride, except where alternative carbon and nitrogen sources are indicated.

- Escobar MA, Dandekar AM (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plants Sci* 8:380–386.
- White CE, Winans SK (2007) Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1135–1148.
- Pappas KM, Winans SC (2003) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol* 48:1059–1073.

**β-Galactosidase Activity, OC8HSL, and Amino Acid Measurements.** Using the strategy described previously (12), the *virB1* promoter was amplified, fused with the reporter gene *lacZ*, and subcloned into the broad host-range vector pME6031. The *attK-lacZ* (12) and *virB1-lacZ* fusions were introduced into *A. tumefaciens* strains by electroporation. Induction with acetosyringone (100 μM) was performed in IB medium (33). The β-galactosidase activity of cells was measured as previously described (12). OC8HSL detection was performed on TLC silica plates (C18-reverse phase, Whatman) using pure OC8HSL (a generous gift from Pr. P. Williams, University of Nottingham) as a standard, and the biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZLR4) (34). The composition of individual amino acids (including GABA) in unwounded and wounded stems of tomato and tobacco plants, and plant tumors was determined by ion-exchange chromatography using an AminoTac JLC-500V amino acid analyzer (35). Wounded tissues were frozen 10 min after cutting 0.1-cm sections from plant stems (9). The amino acids released into the liquid medium by slices of tomato stem and tumor (0.25 g/mL) were also determined using the AminoTac JLC-500V amino acid analyzer.

**Uptake Assays.** GABA uptake assays were performed on cultures of *A. tumefaciens* grown in AB minimal medium. Reactions were initiated by adding [<sup>3</sup>H]-GABA (γ-[2,3-<sup>3</sup>H(N)]-ABA) to cell suspensions (5 × 10<sup>7</sup> CFU/mL) at a final concentration of 1 μM in the presence of unlabelled amino acid at different concentrations. The reaction was terminated by rapid filtration of samples (50 μL) on ultrafiltration membrane (0.22 μm Millipore HA, Millipore), and filter washing three times with 4 mL of AB-medium (13). Filter-bound radioactivity was quantified in a Packard TriCarb 2200 CA liquid scintillation counter. L-[2,3-<sup>3</sup>H]-Pro, L-[3-<sup>3</sup>H]-Ala, L-[2,3,4-<sup>3</sup>H]-Arg, [3,4-<sup>3</sup>H]-Glu, [4,5-<sup>3</sup>H(N)]-Leu, and [2,3-<sup>3</sup>H]-GHB uptake assays were performed using the same protocol. The <sup>3</sup>H-derivatives of GABA (94 Ci/mmol), Pro (49 Ci/mmol), Ala (65 Ci/mmol), Arg (51 Ci/mmol), Glu (50 Ci/mmol), and Leu (56 Ci/mmol) were provided by Perkin-Elmer, and GHB (50 Ci/mmol) by American Radiolabeled Chemicals (USA).

**Plant Assays.** Transfer of T-DNA was performed using the floral dip method (36) with *A. thaliana* (*n* = 48) as plant host and plasmid pCAMBIA3301 as T-DNA donor conferring Basta resistance. The same plasmid pCAMBIA3301 carrying the 35S::GUS-intron transgene was used for evaluating transient expression of T-DNA in infiltrated leaves of 10-week-old tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samson) and infected stem of 8-week-old tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Dona). Before infection, bacterial cells were incubated in MES buffer (pH 5.6) supplemented with acetosyringone (150 μM) according to ref. 5. Then, 2, 4, and 6 days post-infection, GUS staining was performed (37) on sections of tomato stem and disks (1 cm in diameter) excised from tobacco leaves. We measured the number of colored spots per section of tomato stem (*n* = 15), and percentage of GUS-colored surface on each tobacco leaf disk (*n* = 10). Other virulence assays were conducted under greenhouse conditions (9) on stems of 10-week-old tobacco plants (*N. tabacum* L. cv. Samson) and 6-week-old tomato plants (*S. lycopersicum* L. cv. Dona) grown on compost and automatically supplied with water three times per day, as well as on stems of 12-week-old tobacco plants (cv. *Xanthi*) and its *G51* derivative grown on sand and automatically supplied with an ammonium-rich nutrient solution (5 mM NH<sub>4</sub>Cl and 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5) three times daily. Under these conditions, *G51* tobacco plants exhibit lower levels of *G51* mRNA, glutamine synthetase activity, and Pro than the wild-type parent (21). Each stem was incised (4 cm) with a scalpel and infected by approximately 10<sup>6</sup> CFU of *A. tumefaciens* C58 or its derivatives that were picked up from 48-h cultures on LBM-agar plates. The number of tumors per incision was counted 5 weeks (tobacco) or 3 weeks (tomato) post inoculation. Each plant was categorized into five classes of severity symptoms: less than five tumors per infection site; from five to 14, 15 to 29, 30 to 50, or more than 50. Each virulence assay was performed in at least two independent experiments.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank A. Raffoux and T. Huchet for technical assistance; S. Mondy for GUS protocols; Y. Dessaux (Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette) for critical reviewing of the manuscript; and S. Boutet and B. Hirel (Institut National de la Recherche Agronomique-Versailles) for amino acid measurements and the *G51* line. Financial support was provided from Centre National de la Recherche Scientifique-Projet International de Coopération Scientifique “GABA signaling across kingdoms” (D.F.) and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (B.J.S.).

- Yuan ZC, et al. (2007) The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11790–11795.
- Zipfel C, et al. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749–760.
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: Abusing MAPK defense signaling. *Science* 318:453–456.

7. Deeken R, et al. (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: A genome-wide approach. *Plant Cell* 18:3617–3634.
8. Zhang HB, Wang LH, Zhang LH (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4638–4643.
9. Chevrot R, et al. (2006) GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7201–7202.
10. Wächter R, et al. (2003) Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 133:1024–1037.
11. Galvez T, et al. (1999) Mutagenesis and modeling of the GABA<sub>B</sub> receptor extracellular domain support a Venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem* 274:13362–13369.
12. Carlier A, Chevrot R, Dessaux Y, Faure D (2004) In *Agrobacterium tumefaciens* strain C58, the assimilation of  $\gamma$ -butyrolactone interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:951–957.
13. Hosie AH, Allaway D, Galloway CS, Dunsby HA, Poole PS (2002) *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J Bacteriol* 184:4071–4080.
14. Magnusson U, Salopek-Sondi B, Luck LA, Mowbray SL (2004) X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity. *J Biol Chem* 279:8747–8752.
15. Sack JS, Saper MA, Quijoch FA (1989) Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J Mol Biol* 206:171–191.
16. Acher FC, Bertrand HO (2005) Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* 80:357–366.
17. Morera S, Gueguen-Chaignon V, Raffoux A, Faure D (2008) Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial GABA receptor with a Venus flytrap fold. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64:1153–1155.
18. Breikreuz K, et al. (2003) A novel  $\gamma$ -hydroxybutyrate dehydrogenase. Identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency. *J Biol Chem* 278:41552–41556.
19. Hoover GJ, et al. (2007) Characteristics of an *Arabidopsis* glyoxylate reductase: General biochemical properties and substrate specificity for the recombinant protein, and developmental expression and implications for glyoxylate and succinic semialdehyde metabolism in *planta*. *Can J Bot* 85:883–895.
20. Yuan ZC, Haudecoeur E, Faure D, Kerr KF, Nester EW (2008) Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cell Microbiol* 10:2339–2354.
21. Brugière N, et al. (1999) Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* 11:1995–2011.
22. Deuschle K, et al. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J* 27:345–355.
23. Fabro G, Kovacs I, Pavet V, Szabados L, Alvarez MA (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:343–350.
24. Sans N, Schindler U, Schröder J (1988) Ornithine cyclodeaminase from Ti plasmid C58: DNA sequence, enzyme properties and regulation of activity by arginine. *Eur J Biochem* 173:123–130.
25. Farrand SK, Dessaux Y (1986) Proline biosynthesis encoded by the *noc* and *occ* loci of *Agrobacterium* Ti plasmids. *J Bacteriol* 167:732–734.
26. Trovato M, Maras B, Linhares F, Costantino P (2001) The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13449–13453.
27. Mauro ML, et al. (1996) The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Planta* 215:494–501.
28. Haudecoeur E, et al. (2009) Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:529–537.
29. Khan SR, Farrand SK (2009) The BlcC (AttM) Lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol* 191:1320–1329.
30. Anjard C, Loomis WF (2006) GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABA<sub>B</sub> receptor. *Development* 133:2253–2261.
31. Dennis J, Zylstra G (1998) Plasposons: Modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 64:2710–2715.
32. Chilton MD, et al. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and P58 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3672–3676.
33. Winans SC, Kerstetter RA, Nester EW (1988) Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170:4047–4054.
34. Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:1119–1129.
35. Diaz C, et al. (2005) Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*, a metabolic profiling approach. *Plant Physiol* 138:898–908.
36. Clough SJ, Bent A (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743.
37. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907.

### ANNEXE 3

Recent contributions of metagenomics to studies on quorum-sensing and plant-pathogen interactions. In *Metagenomics: current innovations and future trends*

Faure, D., Tannières, M., Mondy, S., and Dessaux, Y.

(2011).. D. Marco (ed.). Caister Academic Press, Norfolk (UK), pp 253-263.





---

# Recent Contributions of Metagenomics to Studies on Quorum-sensing and Plant–Pathogen Interactions

14

Denis Faure, Mélanie Tannières, Samuel Mondy and Yves Dessaux

## Abstract

Though metagenomics is a novel tool in the field of plant–microbe interaction, the technique has already led to remarkable advances. Among these, the identification of yet-uncultivable phytopathogens or the description of the plant and rhizosphere microflora, are two features that may lead to a better description of the quality of agricultural lands, for instance in the case of disease suppressive soils. At a more molecular level, the identification of novel density-dependent regulatory functions (quorum sensing) and antagonizing elements (quorum quenching) that may be used to develop sustainable, biological control strategies directed at plant pathogen, are examples of valuable outcomes of metagenomics in the plant–microbe interaction field.

---

## Introduction

In this chapter, the term ‘metagenomics’ is used according to the definition proposed by Riesenfeld and colleagues (Riesenfeld *et al.*, 2004), i.e. a ‘functional and sequenced-based analysis of the collective microbial genomes contained in an environmental sample’. In this definition, we included direct sequencing of DNA or RNA extracted from environmental samples, and construction, sequencing and functional screening of libraries, as well as PCR-based analysis of gene markers (e.g. *rrs* gene encoding 16S RNA).

With respect to pathogenic microbe–plant interactions, metagenomics has emerged as a novel approach within the last 5 years or so, and major accomplishments are therefore still

limited hence the reduced size of this chapter. Recent metagenomic studies in the field however reported: (i) the discovery and characterization of novel pathogens, as well as in-depth analysis of pathogen functions; (ii) novel strategies to possibly control the virulence of some pathogens, (iii) novel tools to evaluate the environmental impact of plant-protection strategies. With respect to quorum sensing, metagenomics also proved useful to identify novel components involved in this bacterial cell–cell communication process. These components were elements that either permit this regulatory process to occur or elements that antagonize it. Examples of these various achievements are described below.

---

## Metagenomics studies on quorum sensing and quorum quenching

### A brief view at quorum sensing (QS)

Bacteria have evolved sophisticated mechanisms to coordinate gene expression at population and community levels upon different environmental constraints. Numerous bacteria, including plant pathogens can synthesize and sense diffusible molecules which act as signals to trigger gene expression when they reach a threshold concentration. In confined environments, accumulation of the signals reflects bacterial cell density (i.e. the quorum) hence this regulatory process was termed quorum-sensing (QS) by Fuqua *et al.* (1994). In open environments, concentration of the same signal also reflects diffusion coefficient; the term of diffusion sensing was proposed

(Redfield, 2002). Quorum and diffusion sensing contribute to optimize expression of key functions at population level when appropriate conditions are completed (Hense *et al.*, 2007).

### Plant pathogens and quorum-sensing

The QS signals produced by bacterial plant pathogens are diverse (Von Bodman *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2009). They encompass the N-acylhomoserine lactones (AHSLs) which had been found in more than 70 bacterial species in alpha-, beta- and gamma-proteobacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia glumae*, *Pantoea stewartii*, *Pectobacterium atrosepticum* (a non-limitative list); the 3-hydroxypalmitic acid methyl ester (PAME) in *Ralstonia solanacearum*; the diffusible signal factors (DSF) identified as cis-11-methyl-2-dodecanoic acid in *Xanthomonas campestris*; and the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) in *Pseudomonas aeruginosa* (Dessaux *et al.*, 2010). This list is non limitative and novel signal molecules are regularly reported (e.g. Schaefer *et al.*, 2008). Some pathogens produce a combination of different QS signals such as several AHSLs in *Pectobacterium atrosepticum*, and AHSL and PAME in *Ralstonia solanacearum*. The QS-regulated functions are diverse, including the production of extracellular enzymes and proteins (pectinolytic, cellulolytic, proteolytic enzymes), that of antibiotic or antifungal molecules, the modification of surface properties (expolysaccharides), or horizontal transfer of the plasmids harbouring the virulence genes (Uroz *et al.*, 2009). Noticeably, expression of the QS-regulated genes may be modulated in some instances by: (i) QS-independent pathways which reflect the physiological state of bacterial cells, e.g. RpoS, RsmA, in different proteobacteria (Cui *et al.*, 1995; Whiteley *et al.*, 2000), and, (ii) plant host molecules, such as GABA and free proline in *Agrobacterium tumefaciens* (Chevrot *et al.*, 2006; Haudecoeur *et al.*, 2009).

### Modulation of QS regulation by quorum quenching

QS is also modulated by the bacterial community that surrounds the pathogen population and the plant host. Some non-pathogenic bacteria can

produce QS-signal which may act synergistically with those of the pathogens while others can produce compounds and enzymes such as amido-hydrolases or lactonases that can disrupt QS signals emitted and sensed by the pathogen (Uroz *et al.*, 2009). Plant host may also respond to the presence of QS signals (Mathesius *et al.*, 2003), produce anti-QS compounds (Manefield *et al.*, 1999) as well as enzymes degrading QS signals (Delalande *et al.*, 2005). Such natural anti-QS activities, which are also termed as quorum-quenching (QQ), may be adapted to propose novel anti-virulence strategies (Dong *et al.*, 2001; Uroz *et al.*, 2003; review in Zhang, 2003). It should be important to consider that, in some plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR), such as *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas aureofaciens* and *P. chlororaphis*, the antagonistic activities directed at pathogenic micro-organisms are positively regulated by QS (Wood *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2008). From a practical point of view, the implementation of QQ-strategies that target a given pathogen should take in account these data, not to be detrimental to naturally occurring PGPR populations antagonizing other pathogens (Molina *et al.*, 2003).

### Metagenomics, quorum-sensing and quorum quenching

Until the year 2005, studies on QS and QQ only relied upon cultivation-based approaches, therefore ignoring a large part of the microbial diversity of complex environments such as bare soil or plant rhizosphere (Nichols, 2007). Metagenomic therefore appeared as a pertinent strategy to address cell-cell communication at the global microbiome level. Several libraries were screened for: (i) identification of functions and genes which are implicated in the biosynthesis of QS-signals as well as (ii) QQ-enzymes that inactivate QS-signals. Several genes involved in the biosynthesis of QS-signals AHSLs were identified (Williamson *et al.*, 2005). Some of them exhibit a weak homology with those previously identified in cultured bacteria and encode the synthesis of unsaturated and substituted long chain AHSLs that have not been described earlier (Hao *et al.*, 2010). Furthermore, functional metagenomics allowed the identification of QS-mimics. A screen

of 800,000 metagenomic clones obtained from DNA produced from a insect gut microbiota revealed that one clone encodes the synthesis of an indole compound that induce the expression of AHSL-regulated genes in bioindicator strains. This compound is an oxidative derivative of indoxyl (Guan *et al.*, 2007). This type of AHSL mimics has not been reported earlier. Interestingly, because indole itself is a signal involved in the resistance of bacterial population to antibiotics (Lee *et al.*, 2010), the above results revealed a possible cross-talk between different signalling pathways during host–microbe interactions. These examples emphasize the value of metagenomic approaches to identify previously unknown genes and functions involved in QS.

Screening of soil metagenomics libraries also allowed the extension of the diversity of the QQ-enzymes which are able to cleave a large spectrum of AHSL signals. In a library of 10,121 fosmids with 30–50 kb inserts, a single gene expressing a QQ activity was identified. It encodes a lactonase which is only distantly related to previous known lactonase inactivating AHSLs. Interestingly, analysis of genes in the vicinity of the lactonase gene permitted to propose that the cloned DNA region originate from an Acidobacteria while the lactonase gene possibly resulted from a horizontal gene transfer from an alpha-proteobacteria (Riaz *et al.*, 2008). In a second analysed library of 7392 plasmids with 2.5–6 kb inserts, three novel lactonase genes were identified following a similar functional screening (Schipper *et al.*, 2009). In both reports, the lactonases were able to block the expression of virulence in plant and animal pathogens such as *Pectobacterium* and *Pseudomonas*, a feature that may have quite interesting biotechnological outcomes. The apparent different screening efficiency of small insert – versus large insert – libraries may be explained by the necessity to drive the expression of soil DNA genes from a promoter located at the cloning site of the vector in an *E. coli* host. To circumvent this problem, heterologous expression of library in different hosts was proposed (Craig *et al.*, 2010). Interestingly, a simple estimation of the occurrence frequency of QS and QQ functions in the analysed soil metagenome suggests that the diversity and density of organisms which are able to produce or degrade

QS-signals are most likely underestimated when assessed by cultivation-based approaches (D'Angelo-Picard *et al.*, 2005).

Additionally, metagenomics may help to understand variability of QS-linked functions in natural microbial populations. In soil biofilms collected from a mine drainage (Simmons *et al.*, 2008), the authors were able to reconstitute a 'population genome' (20x) which is closely related to *Leptosirillum ferriphilum*. Remarkably, the core QS genes, homologous to the prototypic determinants luxI (AHSL signal synthase) and luxR (regulator of the QS-regulated genes) are located within highly variable regions, suggesting that variants of the populations may be able – or not – to synthesize QS-signals. Such variability of QS functions has also been observed in the pathogen *P. aeruginosa* (Wilder *et al.*, 2009). In another study, metagenomics coupled with competition experiments showed that host-interacting bacteria, such as *Escherichia coli* may sense and use QS-signals produced by host-colonizing bacterial community to optimize its adaptation into specific niches (Hughes *et al.*, 2010).

---

### Metagenomics to study plant–pathogen interactions

For years, investigations on plant–pathogen interactions have relied upon the isolation and cultivation of the pathogen, and been conducted with limited consideration – if any – to the global plant microbial environment. The emergence of the 'omics' techniques, and especially that of metagenomics has changed the situation and allowed important progress in this field. The examples presented below illustrate this assertion.

#### Genomic analysis of uncultured plant pathogens: the case of the citrus Huanglongbing bacteria

Citrus Huanglongbing (HLB, from the words 'huáng lóng bing', literally the yellow dragon disease in Chinese), also known as citrus greening, is a devastating disease which is associated with the presence in the contaminated plants of three uncultured members of the genus '*Candidatus Liberibacter*': '*Ca. L. asiaticus*', '*Ca. L. americanus*', and '*Ca. L. africanus*'. HLB disease agents are



transmitted by phloem-feeding insect vectors such as *Diaphorina citri*. Epidemiological studies on this disease are hampered by the occurrence of a large number of plant reservoirs in which '*Ca. L. asiaticus*', for instance, does not necessarily induce disease. Two consecutive publications (Duan *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2009) described metagenomic approaches to solve the complete genome of '*Ca. L. asiaticus*'. In the first paper, the authors extracted DNA from 15 insects of the genus *D. citri* which contains up to  $10^8$  bacterial cells per insect that consist in a mixture of '*Ca. L. asiaticus*' DNA to *D. citri* DNA (approximated 1:1 copy ratio). The sequence genome (one circular chromosome of 1.23 Mb; 36.5 GC%) was obtained by coupling multiple displacement amplification (MDA) and 454-pyrosequencing, and finishing with the Sanger technique. In the second paper, DNA was isolated from the collected phloem (150 mg) of infected citrus plants, and submitted to 454, SOLiD, and Solexa sequencing. The phloem metagenomic data provided 26-fold coverage of the genome that was previously obtained by the insect set of data. These two papers provided estimation of the bacterial cell density per plant cell and complete genome of the pathogen '*Ca. L. asiaticus*', which is phylogenetically related to *Agrobacterium* and *Rhizobium* alpha-proteobacteria

### Towards analysis of plant microbiota

Constructing metagenomic libraries to investigate the plant microbiota is technically difficult, for several reasons. First, metagenomics of rhizospheric community is challenging because of the complexity of root–soil matrix and the huge diversity of soil microbes (Tringe *et al.*, 2005; Von Mering *et al.*, 2007) and the natural occurrence in soil of compounds such as phenolics, humic and fulvic acids (a non limitative list) that impede biochemical reactions widely used in sequencing or cloning techniques, such as PCR (Wilson, 1997).

Construction of metagenomic libraries from plant tissues is also difficult because DNA preparations obtained from this environment generally contain a large (if not extremely large) proportion of undesirable plant DNA that may dilute 'target' microbial DNA. The above quoted papers (Duan *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2009)

illustrated the difficulties associated with the analysis of metagenomes of plant pathogens living inside plant tissues, and/or transmitted by insect vectors. Some technical improvements have been proposed, however, to enrich DNA fractions in microbial DNA during extraction. Wang and colleagues (2008) reported a SDS/NaCl-based treatment, which allows constructing a metagenomic library with 88% bacterial inserts from tissues of the tropical tree *Mallotus nudiflorus*. The library contains DNA from a large variety of bacterial phyla, including *Actinobacteria* (38–56%), *Proteobacteria* (27 to 39%), *Firmicutes* (2–9%), *Deinococcus–Thermus* (1%), as well as *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadates* and *Bacteroidetes* as minor phyla (<1%). Jiao *et al.* (2006) proposed to lyse plant cell wall enzymatically to release plant nuclear material, and to rely upon a differential centrifugation approach to enrich the preparation in bacterial DNA. Recently, the use of a Nicodenz gradient (Courtois *et al.*, 2001) to recover the bacterial community tightly associated with plant tissues has been successfully implemented (E. Chapelle, unpublished).

Epiphytic community is generally more accessible and has been described in the case of *Arabidopsis thaliana* leaves by combining metagenomics (454 shotgun sequencing and *rrs*-analysis) and metaproteomics (Delmotte *et al.*, 2009) approaches. The recovered microorganisms, of which 99.7% were bacteria, dominantly belonged to (i) the alpha-proteobacteria class (43%) and more precisely to *Methylobacterium* and *Sphingomonas* genera; (ii) *Bacteroidetes* (12%); (iii) beta-proteobacteria (10%); (iv) *Actinobacteria* (10%); (v) gamma-proteobacteria (5%); and (vi) *Endoplasmatales* (2%). In this study, metaproteomics revealed a high occurrence of carbohydrate transporters in *Sphingomonas* suggesting that this feature is an important component of phyllosphere adaptation in this genus.

Metagenomics has also been used to investigate the microbiome of specific plant organs, such as that associated with pitchers of carnivorous plants. A possibility exists that the microbiota of these organs contribute to the ability of the plant to digest trapped insects (Plummer and Jackson, 1963). Catalogues of bacterial diversity were first

obtained by cultivation techniques. Recently, the microbial diversity of the pitcher fluid of *Saracenia alatai* was investigated by a metagenomic approach that revealed the occurrence of over 650 phylogroups at the species level as determined by 454 sequencing of 16S RNA gene fragments. This value must be compared to the 288 taxa identified by automated ribosomal spacer analysis (ARISA) in the same study, and to the 20 species previously identified by cultivation (Koopman *et al.*, 2010), evidencing the critical advancement to the knowledge of microbial diversity that metagenomics allows.

### Population genomics of plant pathogens as a support to metagenomics

*In silico* meta-analysis of pathogen genomes isolated from different samples is also named 'population genomics' (Terauchi and Yoshida, 2010). Even though population genomics is not a metagenomic approach per se, sequencing and comparison of a large number of genomes allow a consolidation of genomic databases which are used for metagenomic analysis, as well as the development of tools for genomic comparison at a large scale.

Population genomics investigate evolution of the pathogen populations, including contribution of horizontal transfer, their taxonomic classification as well as identification of key-functions involved in the host-pathogen interactions. Recent original and review papers deciphering this growing field of research in plant-pathogen interaction had been published, providing new insights on various topics such as: (i) the lifestyle of *Pseudomonas syringae* and its metabolic adaptation to the constraint environment that the leaf surface is (Mithani *et al.*, 2010); (ii) the involvement of effector proteins translocated by type III secretion system on the host range of *Xanthomonas citri* subspecies (Moreira *et al.*, 2010); (iii) the identification of the main determinants of pathogenicity of *X. campestris* pv. *campestris* (He *et al.*, 2007); (iv) the involvement of horizontal transfer in genome evolution of *Ralstonia solanacearum* (Guidot *et al.*, 2009); and, (v) the identification of novel effector-effector target genes for instance in the

plant/*Magnaporthe oryzae* interaction (Terauchi and Yoshida, 2010).

### Metagenomics of disease-suppressive soils

Soils that suppress plant disease, usually named disease-suppressive soils, contain plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) which antagonize plant pathogens (reviews: Weller *et al.*, 2002; Mazzola, 2004). In some of these PGPR, the expression of antagonist functions such as production of the antifungal compounds phenazine may be regulated by QS (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001; Haas and Défago, 2005).

A recent study (Sanguin *et al.*, 2009) investigated the succession and diversity of microbial population in a take-all disease suppressive soil. Suppressiveness was established after 10 years of wheat monoculture, and was not only associated with the presence of PGPR pseudomonads as generally reported but also correlated with the prevalence of a broader range of taxa, 'mainly *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Nitrospira*, *Chloroflexi*, *Alphaproteobacteria* (notably *Azospirillum*) and *Firmicutes* (notably *Thermoanaerobacter*)'.

Other studies investigated the presence of anti-pathogen functions and genes in disease-suppressive soils via a metagenomic approach. Three libraries of 5000, 15,000, and 100,000 clones were screened for, and allowed the identification of, type I polyketide synthases which are involved in the biosynthesis of various antibiotics and therapeutic compounds (Courtois *et al.*, 2003; Ginolhac *et al.*, 2004; van Elsas *et al.*, 2008). Another work has led to the discovery of antibacterial compounds in a metagenomic library generated from DNA extracted from a rhizospheric soil (Gillespie *et al.*, 2002). These authors isolated three clones (out of 25,000 screened) that produced coloured pigments which were identified upon fractionation as turbomycin A and turbomycin B. Both molecules exhibited broad-spectrum antibiotic activity against Gram-negative and Gram-positive organisms. In another study, Hjort *et al.* (2010) compared the diversity of the amplified chitinase encoding genes in total DNA extracted from soil, in a metagenomic library constructed from soil DNA, and in a collection of bacterial isolates exhibiting chitinase and antifungal activities.

These investigations pointed out *Streptomyces* as a dominant soil genus involved in anti-fungal chitinase activity in soil. Another antifungal activity was identified using *Saccharomyces cerevisiae* as a biosensor, upon screening of a ca. 10,000 clone library from a forest soil. Though the active compound(s) was/were not identified, they most likely resulted from the expression of type II polyketide synthase genes (Chung *et al.*, 2008).

The above results demonstrate – should this be necessary – the interest of metagenomic approaches to understand plant-microbe and microbe-microbe interaction in suppressive soils. In agreement, within the last years, an increasing number of reports dealt with functional metagenomics based on the expression of DNA libraries obtained from various soil environments, in single or multiple hosts, to identify potential anti-pathogen, therapeutic or biotechnological functions. Stereoselective amidase, cellulase, alpha-amylase, pectate-pectate lyases (Voget *et al.*, 2003), amidase (Gabor *et al.*, 2004), and unidentified antibacterial molecules (Craig *et al.*, 2010) were just a few examples of the wealth of novel active molecules ‘harvested’ from soil metagenomic exploration.

### Metagenomics and quality of agricultural soils

Because of the multiplicity and complexity of physicochemical and biological factors that typify a soil, the criteria that determine the agricultural quality of a soil remains debated (Batisda *et al.*, 2008). However, soil quality depends in part upon its microbial composition, and the biological function associated with the soil macroflora. Several studies have exemplified the use of metagenomics to investigate soil microbial diversity including that of agricultural soil, the contribution of cultivation-recalcitrant genera to this diversity (Kielak *et al.*, 2009, 2010), and microbial activities favourable to plants such as those described in the above section. Fixed nitrogen (nitrate or ammonium) is often a limiting element within agricultural soils. Denitrification ability is therefore an important aspect of the quality of an agricultural soil. A recent study based on a metagenomic analysis of a 77,000 clone library shed new light on bacterial denitrification, and the diversity of genetic

determinants involved in process (Demanèche *et al.*, 2009).

Soil agricultural quality also depends upon physicochemical traits, such as the presence of pollutants deleterious to plant growth. A combination of denaturing gradient gel electrophoresis targeting the 16S rRNA gene and a metagenomic analysis of 16sRNA genes revealed that members of the *Actinobacteria* and *Bacillus* phyla were affected by the presence of monocyclic aromatic compounds in contaminated forest soils (Ji *et al.*, 2007). In addition, a metagenomic study aimed at identifying microbial community associated with pioneer plants growing in heavy metal-contaminated fallow soils (Navarro-Noya *et al.*, 2010). It revealed that the microbial communities associated with two unrelated plant species growing in the contaminated soil, although quite different from the microbial community of the same bare soil (a phenomenon known as the rhizosphere effect; Hartman *et al.*, 2008), exhibited related species richness, relative abundance, and phylogenetic traits. Similar metagenomic-based studies have led to the identification of novel nickel resistance genes in the rhizosphere microbial community of plants adapted to acid mine drainage (Miret *et al.*, 2007).

Agriculture worldwide heavily relies upon the use of phytochemical compounds, the unwellcome effects of which being possibly deleterious to non target organisms such as microbes. In this respect, a metagenomic approach has been used to evaluate the consequence of the use of chlorinated pesticides on the plant-associated and soil microflora (Manickam *et al.*, 2010). Still in this field, an original work described the biostimulation of anti-pathogen function of the rhizosphere microbiome of *Solanum tuberosum*, upon amendment with gamma-caprolactone. This molecule induces a modification of the structure of the bacterial community that had been evaluated by an rrs-based diversity approach that led to an increase density of members of the species *Rhodococcus erythropolis*, the metabolic activity of which interfered with the expression of the pathogenic functions of *Pectobacterium carotovorum* (Cirou *et al.*, 2007).

### Further orientation of metagenomic techniques for studying plant–microbe interaction

As stated in the introduction, metagenomics has only emerged recently as a tool to study plant–microbe interactions. However, publications dealing with other environments indicate how much this methodology could bring to this field of investigation. A look at soil (Kielak *et al.*, 2009; 2010), marine waters or sediments (Cuvelier *et al.*, 2010; Quaiser *et al.*, 2010), extreme environments (Wang *et al.*, 2009; Brazelton *et al.*, 2010), or digestive tractus (Ventura *et al.*, 2009) indeed revealed that metagenomics can help us to improve our description of the microbial diversity associated with plants, and especially that of detrimental or beneficial organisms, even yet-uncultured ones (Da Rocha *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2009, Tyler *et al.*, 2009).

Metagenomic studies also provided valuable data on the identification of key functions of the microbiome, again irrespectively of the environment, such as, metal resistance (González-Pastor and Mirete, 2010), production of secondary metabolites (Banik and Brady, 2010), nitrification and denitrification (Wang *et al.*, 2009), etc. More generally, metagenomic also helped us to gain a comprehensive view at the way ecosystems work, respond to environmental changes (Turnbaugh *et al.*, 2009), or dysfunction (Morowitz *et al.*, 2010). Preliminary data obtained in natural or mesocosm ecosystems revealed remarkable shifts affecting the rhizosphere microflora in response to elevated carbon dioxide concentrations (He *et al.*, 2010) or the nitrogen-fixing community upon disturbance and restoration of an alpine grassland ecosystem (Gros *et al.*, 2006).

In agronomy, metagenomics may contribute to a better evaluation of the consequence of agricultural practices on the soil and plant-interacting community, including prokaryotes and eukaryotes. These practices includes the use of phytochemicals (Zaprasis *et al.*, 2009), the likely development of winter soil cover (to reduce nitrate concentration in soil and surface water) and the use of phosphate fertilizers (Carvalho *et al.*, 2007), or the release of genetically modified

organisms (S. Mondy and Y. Dessaux, unpublished).

Within the QS and QQ field, metagenomics has already proved to be useful to identify novel genes, signal molecules, signal mimics, or signal degradative activities (see the relevant above section). However, only one class of signals (the AHLs) has been preferentially investigated, and only a very limited number of environments have been searched. Clearly, exploration of other environments, including the more ‘exotic’ ones will permit identification of both inter-kingdom communication process and novel molecules and activities of therapeutic and agricultural importance.

Finally, at least, two challenges remain. The first deals with the various biases associated with metagenomic techniques which forced the investigator to question the representativeness of the investigated extracted, amplified or sequenced DNA (Hong *et al.*, 2009; Gomez-Alvarez *et al.*, 2009; Temperton *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2010) and the reproducibility of results (Pan *et al.*, 2010). This problem may be solved in part by using combination of protocols, various cloning vectors, and various hosts to investigate heterologous gene expression. The second challenge lies in the integration of metagenomics with other ‘omics’ techniques (transcriptomics, proteomics, metabolomics) (see Chapters 1 and 12). This expectation faces two difficulties in addition to the above described problems that apply to both RNA and DNA extraction in the case of transcriptomic studies (McIlroy *et al.*, 2009). The first one is to be able to keep the samples under satisfactory physiological conditions, in such a way that the data obtained from proteomics or metabolomics are biological significant (Valenzuela *et al.*, 2006). The second difficulty is to be able to ‘extract the information from the soup’ (Rosen *et al.*, 2009), a feature that will require a strong ability to ‘surf on massive data streams’ (Martin and Martin, 2010). It is our opinion that for the time being, the weak joint in further development of ‘meta-omics’ approaches lies there.

### References

Banik, J.J., and Brady, S.F. (2010). Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of



- antimicrobials and other bioactive small molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 603–609.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., and García, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147, 159–171.
- Brazelton, W.J., and Baross, J.A. (2010). Metagenomic comparison of two *Thiomicrospira* lineages inhabiting contrasting deep-sea hydrothermal environments. *PLoS One* 5, e13530.
- Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., and Reis, M.A. (2007). Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Res.* 41, 4383–4396.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B.J., Ron, E., and Faure, D. (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7460–7464.
- 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., and 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.
- Chung, E.J., Lim, H.K., Kim, J.C., Choi, G.J., Park, E.J., Lee, M.H., Chung, Y.R., and Lee, S.W. (2008). Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 723–730.
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., and Faure, D. (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ. Microbiol.* 9, 1511–1522.
- Courtois, S., Frostegård, A., Göransson, P., Depret, G., Jeannin, P., and Simonet, P. (2001). Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.* 3, 431–439.
- Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynyck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osborne, M.S. *et al.* (2003). Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 49–55.
- Craig, J.W., Chang, F.Y., Kim, J.H., Obiajulu, S.C., and Brady, S.F. (2010). Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1633–1641.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C.K., and 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.
- Cuvelier, M.L., Allen, A.E., Monier, A., McCrow, J.P., Messié, M., Tringe, S.G., Woyke, T., Welsh, R.M., Ishoey, T., Lee, J.H. *et al.* (2010). Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14679–14684.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., and Dessaux, Y. (2005). Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7, 1796–1808.
- Da Rocha, U.N., van Overbeek, L., and Van Elsas, J.D. (2009). Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 313–328.
- Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasmri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P. *et al.* (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.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C., and Vorholt, J.A. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16428–16433.
- Demanèche, S., Philippot, L., David, M.M., Navarro, E., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2009). Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 534–537.
- Dessaux, Y., Chapelle, E., and Faure, D. (2010). Quorum sensing and quorum quenching in soil ecosystems. In *Biocommunication in Soil Microorganisms*, Witzany, G., ed. (Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer), pp. 339–367.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411, 813–817.
- Duan, Y., Zhou, L., Hall, D.G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C.M., Gabriel, D.W., Williams, K.P. *et al.* (2009). Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1011–1020.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the *luxR-luxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., and Janssen, D.B. (2004). Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ. Microbiol.* 6, 948–958.
- Gillespie, D.E., Brady, S.F., Bettermann, A.D., Cianciotto, N.P., Liles, M.R., Rondon, M.R., Clardy, J., Goodman, R.M., and Handelsman, J. (2002). Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4301–4306.

- Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T.M., Perrière, G., Simonet, P. *et al.* (2004). Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5522–5527.
- Gomez-Alvarez, V., Teal, T.K., and Schmidt, T.M. (2009). Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME J.* *3*, 1314–1317.
- González-Pastor, J.E., and Mirete, S. (2010). Novel metal resistance genes from microorganisms: a functional metagenomic approach. *Methods Mol. Biol.* *668*, 273–285.
- Gros, R., Jockey-Monrozier, L., and Faivre, P. (2006). Does disturbance and restoration of alpine grassland soils affect the genetic structure and diversity of bacterial and N<sub>2</sub>-fixing populations? *Environ. Microbiol.* *8*, 1889–1890.
- Guan, C., Ju, J., Borlee, B.R., Williamson, L.L., Shen, B., Raffa, K.F., and Handelsman, J. (2007). Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 3669–3676.
- Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P., and Bertolla, F. (2009). Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME J.* *3*, 549–562.
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 307–319.
- Hao, Y., Winans, S.C., Glick, B.R., and Charles, T.C. (2010). Identification and characterization of new LuxR/LuxI-type quorum sensing systems from metagenomic libraries. *Environ. Microbiol.* *12*, 105–117.
- Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* *312*, 7–14.
- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannières, M., Shelp, B.J., Moréra, S., and Faure, D. (2009). Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 14587–14592.
- He, Y.Q., Zhang, L., Jiang, B.L., Zhang, Z.C., Xu, R.Q., Tang, D.J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J. *et al.* (2007). Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol.* *8*, R218.
- He, Z., Xu, M., Deng, Y., Kang, S., Kellogg, L., Wu, L., Van Nostrand, J.D., Hobbie, S.E., Reich, P.B., and Zhou, J. (2010). Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of below-ground microbial communities at elevated CO<sub>2</sub>. *Ecol. Lett.* *13*, 564–575.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J.U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 230–239.
- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., Epstein, S.S. (2009). Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J.* *3*, 1365–1373.
- Hjort, K., Bergström, M., Adesina, M.F., Jansson, J.K., Smalla, K., and Sjöling, S. (2010). Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* *71*, 197–207.
- Hughes, D.T., Terekhova, D.A., Liou, L., Hovde, C.J., Sahl, J.W., Patankar, A.V., Gonzalez, J.E., Edrington, T.S., Rasko, D.A., and Sperandio, V. (2010). Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 9831–9836.
- Ji, S.C., Kim, D., Yoon, J.H., and Lee, C.H. (2007). Metagenomic analysis of BTEX-contaminated forest soil microcosm. *J. Microbiol. Biotechnol.* *17*, 668–672.
- Jiao, J.Y., Wang, H.X., Zeng, Y., and Shen, Y/M. (2006). Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 830–837.
- Kielak, A., Pijl, A.S., Van Veen, J.A., and Kowalchuk, G.A. (2009). Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME J.* *3*, 378–382.
- Kielak, A., Rodrigues, J.L., Kuramae, E.E., Chain, P.S., van Veen, J.A., and Kowalchuk, G.A. (2010). Phylogenetic and metagenomic analysis of Verrucomicrobia in former agricultural grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* *71*, 23–33.
- Koopman, M.M., Fuselier, D.M., Hird, S., and Carstens, B.C. (2010). The carnivorous pale pitcher plant harbors diverse, distinct, and time-dependent bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 1851–1860.
- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* *467*, 82–85.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., and Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* *145*, 283–291.
- Manickam, N., Pathak, A., Saini, H.S., Mayilraj, S., and Shanker, R. (2010). Metabolic profiles and phylogenetic diversity of microbial communities from chlorinated pesticides contaminated sites of different geographical habitats of India. *J. Appl. Microbiol.* *109*, 1458–1468.
- Martin, N.F., and Martin, F. (2010). From galactic archeology to soil metagenomics – surfing on massive data streams. *New Phytol.* *185*, 343–347.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., and 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.
- Mazzola, M. (2004). Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annu. Rev. Phytopathol.* *42*, 35–59.

- McIlroy, S.J., Porter, K., Seviour, R.J., and Tillett, D. (2009). Extracting nucleic acids from activated sludge which reflect community population diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 593–605.
- Mirete, S., de Figueras, C.G., and González-Pastor, J.E. (2007). Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6001–6011.
- Mithani, A., Hein, J., and Preston, G.M. (2010). Comparative analysis of metabolic networks provides insight into the evolution of plant pathogenic and non-pathogenic lifestyles in *Pseudomonas*. *Mol. Biol. Evol.* Aug 13 (Epub ahead of print).
- Mocali, S., and Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Res. Microbiol.* 161, 497–505.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B., and 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.
- Moreira, L.M.; Almeida Jr, N.F., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., da Silva, A.C., da Silva, A.M., de Moraes, F.E., de Oliveira, J.C. et al. (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* 11, 238.
- Morgan, J.L., Darling, A.E., and Eisen, J.A. (2010). Metagenomic sequencing of an *in vitro*-simulated microbial community. *PLoS One.* 5, e10209.
- Morowitz, M.J., Poroyko, V., Caplan, M., Alverdy, J., and Liu, D.C. (2010). Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 125, 777–785.
- Müller, H., Westendorf, C., Leitner E, Chernin, L., Riedel, K., Schmidt, S., Eberl, L., Berg, G. (2009). Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 468–478.
- Navarro-Noya, Y.E., Jan-Roblero, J., González-Chávez Mdel, C., Hernández-Gama, R., and Hernández-Rodríguez, C. (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopada* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97, 335–349.
- Nichols, D. (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 351–357.
- Pan, Y., Bodrossy, L., Frenzel, P., Hestnes, A.G., Krause, S., Lüke, C., Meima-Franke, M., Siljanen, H., Svenning, M.M., Bodelier, P.L. (2010). Impacts of inter- and intralaboratory variations on the reproducibility of microbial community analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7451–7458.
- Plummer, G.L., and Jackson, T.H. (1963). Bacterial activities within the sarcophagus of the insectivorous plant, *Sarracenia flava*. *Am. Midl. Nat.* 69, 462–469.
- Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., and López-García, P. javascript:AL\_get(this, 'jour', 'ISME J');(2010). Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME J.* Jul 29 javascript:AL\_get(this, 'jour', 'ISME J'); (Epub ahead of print). [\[More details?\]](#)
- Redfield, R.J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10, 365–370.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A. et al. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11, 379.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2008). A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ. Microbiol.* 10, 560–570.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38, 525–552.
- Rosen, G.L., Sokhansanj, B.A., Polikar, R., Bruns, M.A., Russell, J., Garbarine, E., Essinger, S., and Yok, N. (2009). Signal processing for metagenomics: extracting information from the soup. *Curr Genomics* 10, 493–510.
- Sanguin, H., Sarniguet, A., Gazengel, K., Moëne-Loccoz, Y., and Grundmann, G.L. (2009) Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytol.* 184, 694–707.
- Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G., Peres, C.M., Schmidt, S., Juhaszova, K., Sufirin, J.R. et al. (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454, 595–599
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., Streit, W.R. (2009). Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 224–233.
- Simmons, S.L., Dibartolo, G., Deneff, V.J., Goltsman, D.S., Thelen, M.P., and Banfield, J.F. (2008). Population genomic analysis of strain variation in *Leptospirillum* group II bacteria involved in acid mine drainage formation. *PLoS Biol.* 6:e177.
- Straight, P.D., and Kolter, R. (2009) Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu Rev Microbiol.* 63, 99–118.
- Temperton, B., Field, D., Oliver, A., Tiwari, B., Mühling, M., Joint, I., and Gilbert, J.A. (2009) Bias in assessments of marine microbial biodiversity in fosmid libraries as evaluated by pyrosequencing. *ISME J.* 3, 792–796.
- Terauchi, R., and Yoshida, K. (2010). Towards population genomics of effector–effector target interactions. *New Phytol.* 187, 929–939.
- Tringe, S.G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C. et al. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science.* 308, 554–557.

- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1 (6ra14), 1–19.
- Tyler, H.L., Roesch, L.F., Gowda, S., Dawson, W.O., and Triplett, E.W. (2009). Confirmation of the sequence of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1624–1634.
- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasmri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., and 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., Dessaux, Y., and Oger, P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem.* 10, 205–216.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Jerez, C.A. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24, 197–211.
- Van Elsas, J.D., Speksnijder, A.J., and Van Overbeek L.S. (2008). A procedure for the metagenomics exploration of disease suppressive soils. *J. Microbiological Methods* 75, 515–522.
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., and Streit, W.R. (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6235–6242.
- Von Bodman, S.B., Bauer, W.D., and Coplin, D.L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 455–482.
- Von Mering, C., Hugenholtz, P., Raes, J., Tringe, S.G., Doerks, T., Jensen, L.J., Ward, N., and Bork, P. (2007). Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* 315, 1126–1130.
- Ventura, M., Turrioni, F., Canchaya, C., Vaughan, E.E., O'Toole, P.W., and van Sinderen, D. (2009). Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Front. Biosci.* 14, 3214–3221.
- Wang, F., Zhou, H., Meng, J., Peng, X., Jiang, L., Sun, P., Zhang, C., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., He, Z. *et al.* (2009). GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 106, 4840–4805.
- Wang, H.X., Geng, Z.L., Zeng, Y., and Shen, Y.M. (2008). Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. *Environ. Microbiol.* 10, 2684–2691.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B., and Thomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–48.
- Whiteley, M., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 4356–4360.
- Wilder, C.N., Allada, G., and Schuster, M. (2009). Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun.* 77, 5631–5639.
- Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C., Allen, H.K., and Handelsman, J. (2005). Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6335–6344.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P., and Pierson 3rd, L.S. (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.
- Zapras, A., Liu, Y.J., Liu, S.J., Drake, H.L., and Horn, M.A. (2009). Abundance of novel and diverse tfdA-like genes, encoding putative phenoxyalkanoic acid herbicide-degrading dioxygenases, in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 119–128.
- Zhang, L.H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant. Sci.* 8, 238–244.





## **Interruption de la communication bactérienne dans la rhizosphère via la dégradation enzymatique des signaux *quorum sensing* (QS)**

L'identification, chez divers organismes, d'enzymes de dégradation des N-acyl homosérines lactones (NAHLs) impliquées dans la signalisation QS pose la question de leurs rôles dans les interactions bactéries-eucaryotes. Dans une première partie, une synthèse bibliographique analyse les connaissances acquises sur ces enzymes dégradant les NAHLs. Dans une seconde partie, la croissance des bactéries dégradant les signaux NAHLs a été stimulée par l'application de  $\gamma$ -caprolactone (GCL) dans la rhizosphère de plants de pommes de terre à des fins de phytoprotection. L'effet de ce traitement sur la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques a été évalué en combinant différentes approches d'écologie microbienne moléculaire comme la DGGE, le pyroséquençage d'amplicons *rrs*, et la métagénomique fonctionnelle. Cette dernière approche appliquée à une banque de 30 000 clones environ a conduit à l'identification d'un gène *qsdB* codant la dégradation des signaux NAHL. Ce travail révèle ainsi l'existence d'une nouvelle classe d'enzymes de dégradation des NAHLs appartenant à la famille des enzymes possédant une signature amidase (AS) dont des membres sont par ailleurs impliqués dans la dégradation de composés xénobiotiques. Dans une troisième partie, un système expérimental a été développé afin de mesurer le transfert conjugatif du plasmide de virulence Ti (*tumor inducing*) chez des dérivés du pathogène *Agrobacterium tumefaciens*, appelés « tricheurs », incapables de produire des signaux NAHLs mais utilisateurs de ceux produits par les autres bactéries. Ce modèle a permis de montrer l'effet modérateur de lactonases dégradant les NAHLs exprimées chez des Agrobactéries produisant les NAHLs, chez des bactéries réceptrices du plasmide Ti, ou des plantes hôtes des Agrobactéries sur le transfert conjugatif initié par les tricheurs. L'ensemble de ce travail révèle à la fois une nouvelle famille d'enzymes impliquées dans la dégradation des NAHLs, ainsi qu'un nouveau rôle de ces enzymes dans la modulation des flux de gènes entre bactéries phytopathogènes en interaction avec une plante hôte.

**Mots clefs:** *quorum sensing*, *quorum quenching*, métagénomique, AS family, tricheur, *Agrobacterium*

### **Disruption of bacterial communication in rhizosphere by enzymatic degradation of the *quorum sensing* (QS) signals.**

Identification of bacterial and eukaryotic enzymes that degrade N-acyl homoserine lactones (NAHLs), involved in QS signaling raises the question of their roles in bacteria-eucaryote interactions. In a first part of this work, a bibliographic report analyzes the current data on those NAHL-degrading enzymes. In a second part, the growth of NAHL-degrading bacteria was stimulated by  $\gamma$ -caprolactone (GCL) amendment in potato rhizosphere to protect this plant against the soft-rot pathogen *Pectobacterium*. The effect of the GCL-treatment on rhizospheric bacterial communities was evaluated by a combination of different molecular microbial ecology techniques, such as *rrs*-DGGE, *rrs*-pyrosequencing and functional metagenomic. This last approach was applied to generate a metagenomic library of ca. 30,000 clones and lead to the identification of the *qsdB* gene that encodes NAHL degradation. This work revealed the occurrence of a novel class of NAHL-degrading enzymes that belong to the amidase signature (AS) family, some members of which being involved in xenobiotic compounds degradation. In a third part, an experimental system was developed to measure the conjugative transfer of Ti plasmid in various strains of the pathogen *Agrobacterium tumefaciens*, including “cheaters”, i.e. bacteria unable to produce NAHL signals but capable to use signals produced by other bacteria. Using this model, variations of plasmid transfer of cheaters were measured when NAHL-degrading lactonases were expressed in Agrobacteria that produce NAHL signals, in recipient bacteria of Ti plasmid, or in agrobacterial host plant. Taken together, these experiments revealed a novel class of enzymes involved in NAHL-degradation and a new role for those enzymes in the modulation of gene transfer between pathogenic bacteria interacting with host plants.

**Keywords:** *quorum sensing*, *quorum quenching*, metagenomics, AS family, cheater, *Agrobacterium*