



**HAL**  
open science

# Le Quorum Sensing chez la bactérie marine *Shewanella woodyi*: Rôle dans l'émission de luminescence et dans la formation du biofilm

Mahmoud Hayek

## ► To cite this version:

Mahmoud Hayek. Le Quorum Sensing chez la bactérie marine *Shewanella woodyi*: Rôle dans l'émission de luminescence et dans la formation du biofilm. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Toulon, 2018. Français. NNT : 2018TOUL0008 . tel-02426221

**HAL Id: tel-02426221**

**<https://theses.hal.science/tel-02426221v1>**

Submitted on 2 Jan 2020

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »**

**Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin**

**THÈSE** présentée par :

**Mahmoud HAYEK**

Soutenue le : 17 mai 2018

Pour obtenir le grade de Docteur en science de la vie et de la santé

Spécialité : Microbiologie

**Le Quorum sensing chez la bactérie marine  
*Shewanella woodyi* : Rôle dans l'émission de  
luminescence et dans la formation du biofilm**

THÈSE dirigée par : Pr MOLMERET Maëlle Directrice de thèse  
Pr BLACHE Yves Co-directeur de thèse  
Dr BARAQUET Claudine Co-encadrante de thèse

**JURY :**

|                                                |                                                     |                                   |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>M<sup>me</sup> WISNIEWSKI-DYE, Florence</b> | Professeur des universités<br>Université Lyon 1     | <b>Rapporteur</b>                 |
| <b>M. MEJEAN Vincent</b>                       | Directeur de recherche<br>CNRS                      | <b>Rapporteur</b>                 |
| <b>M. BAZIRE Alexis</b>                        | Maître de conférences<br>Université de Bretagne Sud | <b>Examineur</b>                  |
| <b>M. ATOUI Ali</b>                            | Professeur des universités<br>Université libanaise  | <b>Invité</b>                     |
| <b>M<sup>me</sup> MOLMERET Maëlle</b>          | Professeur des universités<br>Université de Toulon  | <b>Directrice de<br/>thèse</b>    |
| <b>M. BLACHE Yves</b>                          | Professeur des universités<br>Université de Toulon  | <b>Co-directeur<br/>de thèse</b>  |
| <b>M<sup>me</sup> BARAQUET Claudine</b>        | Maître de conférences<br>Université de Toulon       | <b>Co-encadrante<br/>de thèse</b> |



## Remerciements

---

Cette thèse a été réalisée à l'université de Toulon au Laboratoire « Matériaux Polymères Interface Environnement Marin » (MAPIEM) que je tiens à remercier dès le début ainsi que ses directeurs successifs, le Pr André MARGAILLAN et le Pr Jean-François CHAILAN pour leur accueil et pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire. J'adresse mes remerciements également à l'association de spécialisation et d'orientation scientifique située au Liban pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse, en m'octroyant une bourse de recherche.

Je tiens à remercier vivement ma directrice de thèse le Pr Maëlle MOLMERET ainsi que mon co-directeur le Pr Yves BLACHE et ma co-encadrante le Dr Claudine BARAQUET, pour leur aide, leurs conseils, leur franchise et leur rigueur scientifique. Merci Maëlle, pour le temps que tu as consacré à l'encadrement de ma thèse, ton aide et tes encouragements. C'est grâce à ta confiance que j'ai pu m'accomplir totalement dans cette mission. Merci Yves pour ta gentillesse, ton aide dans la correction du manuscrit, tes nombreux conseils qui ont aboutie à la finalisation de cette thèse et pour ton humour qui enlève le stress de la journée et qui restera longtemps dans mes souvenirs. Merci Claudine, tu m'as toujours impressionné par ta vaste culture scientifique. Ton aide et tes conseils m'ont vraiment fait progresser, trouvant toujours une solution aux problèmes rencontrés dans ma vie professionnelle autant que dans ma vie quotidienne.

Je n'oublie pas de remercier M. Raphaël Lami du laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM) à Banyuls pour la collaboration qu'on a fait et pour ses conseils et son aide dans la réalisation des expériences de RT-qPCR.

Je remercie également tous les membres du jury, Mme Florence WISNIEWSKI-DYE, M. Vincent MEJEAN, M. Alexis BAZIRE ainsi que l'invité, M. Ali ATOUI pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Vous avez toute ma gratitude car malgré des emplois du temps chargé et malgré la distance, vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'espère donc que ce manuscrit sera à la hauteur de vos attentes.

Merci à Mme Patricia CASANOVA pour sa gentillesse et pour la réalisation de toutes les démarches administratives pour arriver à ce moment où je soutiens ma thèse.

Merci aux stagiaires avec lesquels j'ai travaillé sur ce sujet de thèse. Justine DEFRANCE et Antton-Bixente CASEZ.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire MAPIEM et surtout à Anne DELARUE, Brigitte GEDOUX, Raphaëlle BARRY et Ahmad FAHS pour toutes les commandes de tout le matériel et les produits qui ont été nécessaires pour réaliser cette thèse. Je n'oublie pas Marlène LEJARS qui m'a donné beaucoup de conseils et des informations concernant la sécurité et le bon déroulement du travail au laboratoire. Je te promets de ne pas oublier la blouse et les lunettes de sécurité lors de mes prochaines manipulations dans un laboratoire. Il ne faut pas que j'oublie également Bruno VIGUIER qui m'a aidé dans la réalisation des expériences de LCMS et enfin les autres personnes avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, Benoît, Vitalys, Lina, Nadine, Sirine, Isis, Roberto et Clément.

Un merci particulier à la fille charmante Manar HARB qui lors de son arrivé en France a changé ma vie. Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble, pour tes conseils, tes encouragements. Tu étais toujours là pour m'aider autant au laboratoire que dans la vie quotidienne. Merci pour les bons repas que tu prépares. Grace à toi j'ai grossi et j'ai changé toutes mes chemises et T-shirt. Tu as été mon énergie quand je n'en avais plus, tu as été ma moralité quand je n'en possédais plus. Vraiment, un grand merci pour toi Manar. C'est simplement toi qui manquais à ma vie.

Merci aux gens avec qui j'ai partagé le même bureau pendant ma thèse, Cynthia, Ahlem, Mireille et Aurore pour les excellents moments partagés. Egalement parmi les gens qui n'ont pas été cités précédemment, Richard et Emmanuel. Richard, merci pour ton aide dans le réglage du microscope à balayage laser confocal et un autre merci parce que tu ne m'as jamais corrigé mon français, ce qui ne m'a pas aidé à améliorer ma langue pendant ces années. Maintenant, je compte remercier Benoît qui lors de son arrivé au laboratoire à commencer à me corriger. Emmanuel, merci pour tous les beaux moments qu'on a partagé et surtout sur le terrain de football où tu me faisais penser à D. DROGBA.

Je remercie chaleureusement M. le cavalier Houssein BALLOUK, pré-doctorant à l'université de Nice, que j'ai passé avec lui des excellents moments surtout en jouant le jeu d'échecs.

Enfin, Je remercie toute ma famille du Liban pour leur soutien sans faille et leurs encouragements par leurs appels qui m'ont permis de tenir malgré l'éloignement et de me dépasser. Je n'aurai rien pu faire sans vous !



## Production scientifique

---

### Publication :

M. Hayek, C. Baraquet, R. Lami, Y. Blache and M. Molmeret. «The marine bacterium *Shewanella woodyi* secretes C8-HSL to regulate bioluminescence» - 2018

### Communication par affiche :

M. Hayek, C. Baraquet, Y. Blache and M. Molmeret. «*Shewanella woodyi* MS32: A new bioluminescent biosensor able to detect C8-AHL» - FEMS -July 2017

M. Hayek, C. Baraquet, Y. Blache and M. Molmeret. «Characterization of *Shewanella woodyi* Quorum Sensing systems» - ICMCF – 2016 (prix poster)

### Autres activités scientifiques :

Participation à l'organisation d'un congrès international – 18th ICMCF (Internatinal Congress on Marin Corrosion and Fouling) - Juin 2016

Fête de la science - Organisation d'un atelier en microbiologie marine – 2014, 2015 et 2016





## Liste des abréviations

---

|              |                                                        |
|--------------|--------------------------------------------------------|
| 3-OH-Cx-HSL  | 3-hydroxy(nom de chaîne carboné) -L-homosérine lactone |
| 3-oxo-Cx-HSL | 3-oxo(nom de chaîne carboné) -L-homosérine lactone     |
| ABA          | Acide abscissique                                      |
| Acyle-ACP    | Protéine porteuse d'acyle                              |
| AHL          | acyle homosérine lactone                               |
| AI           | Auto-inducteur                                         |
| AIP          | auto-inducteur peptidique                              |
| AMC          | <i>Activated methyl cycle</i>                          |
| Amp          | Ampicilline                                            |
| ARNm         | ARN messenger                                          |
| ASW          | <i>Artificial sea water</i>                            |
| CAI-1        | <i>Cholera autoinducer 1</i>                           |
| C-di-GMP     | Di-guanosine monophosphate cyclique                    |
| CDP          | Dipeptide cyclique                                     |
| CLSM         | Microscopie à balayage laser confocal                  |
| Cm           | Chloramphénicol                                        |
| Ct           | Domaine C-terminal                                     |
| Cx-HSL       | N-(nom de chaîne carboné)-L-homosérine lactone         |
| DAP          | Acide diaminopimélique                                 |
| DKP          | diketopiperazine                                       |
| DO           | Densité optique                                        |
| DPD          | 4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione                         |
| DSF          | <i>Diffusible signal factor</i>                        |
| EPS          | substances polymériques extracellulaires               |

|       |                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| FMNH  | Flavine mononucléotide                                       |
| FMNH2 | Flavine mononucléotide reduite                               |
| GBL   | Gamma butyrolactone                                          |
| Gent  | Gentamycine                                                  |
| GPAP  | Gelatinase biosynthesis activating pheromone                 |
| Gram- | Gram négatif                                                 |
| Gram+ | Gram positif                                                 |
| HHQ   | 2-heptyle-4(1 <i>H</i> )-hydroxyquinoline                    |
| HSL   | homosérine lactone                                           |
| IAA   | Acide indole-3-acétique                                      |
| IPTG  | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside                 |
| Kan   | Kanamycine                                                   |
| LB    | Luria Broth                                                  |
| LBA   | Luria Broth agar                                             |
| MA    | Marine agar                                                  |
| MB    | Marine Broth                                                 |
| MTA   | methylthioadénosine                                          |
| MTAN  | 5'-methyl-thioadenosine/S-adenosyl-homocysteine nucleosidase |
| NSS   | <i>Nine salt solution</i>                                    |
| Nt    | Domaine N-terminal                                           |
| PAME  | <i>Palmitic acid methyl ester</i>                            |
| PBS   | <i>Phosphate buffered saline</i>                             |
| PCR   | <i>Polymerase chain reaction</i>                             |
| PQS   | <i>Pseudomonas quinolone signal</i>                          |
| QQ    | <i>Quorum Quenching</i>                                      |
| QS    | <i>Quorum sensing</i>                                        |

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| R-THMF        | (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran        |
| SAH           | S-adénostylhomocysteine                                     |
| SAHH          | SAH hydrolase                                               |
| SAM           | S-adénosylméthionine                                        |
| sARN          | Petit ARN régulateur                                        |
| SRH           | S-ribosyl-L-homocystéine                                    |
| S-THMF-borate | (2S,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate |
| Stm           | Streptomycine                                               |
| Tm            | Température de fusion                                       |
| VNSS          | <i>Vaatamen nine salt solution</i>                          |
| VNSSA         | <i>Vaatamen nine salt solution agar</i>                     |
| X-gal         | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside    |



# Tables des matières

---

|                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Remerciements.....                                                               | 3          |
| Production scientifique .....                                                    | 7          |
| Liste des abréviations .....                                                     | 9          |
| Tables des matières .....                                                        | 13         |
| Liste des illustrations – Figures.....                                           | 21         |
| Liste des illustration – Tableaux .....                                          | 25         |
| <i>Chapitre I : Revue bibliographique.....</i>                                   | <i>:27</i> |
| <b>1. Le biofilm en milieu marin.....</b>                                        | <b>29</b>  |
| <b>1.1. Définition.....</b>                                                      | <b>29</b>  |
| <b>1.2. Etapes de la formation du biofilm.....</b>                               | <b>29</b>  |
| 1.2.1. Conditionnement de surface et adhésion des bactéries .....                | 30         |
| 1.2.2. Maturation du biofilm.....                                                | 31         |
| 1.2.3. Dispersion du biofilm .....                                               | 31         |
| <b>1.3. Conséquences de la formation du biofilm marin .....</b>                  | <b>32</b>  |
| <b>1.4. Régulation génétique de la formation du biofilm .....</b>                | <b>32</b>  |
| <b>2. Quorum sensing .....</b>                                                   | <b>36</b>  |
| <b>2.1. Définition.....</b>                                                      | <b>36</b>  |
| <b>2.2. Mécanisme général du QS bactérien.....</b>                               | <b>36</b>  |
| <b>2.3. Les différents systèmes de QS .....</b>                                  | <b>37</b>  |
| 2.3.1. Système d'acyle homosérine lactone (AHL) ou d'auto-inducteur 1 (AI1)..... | 37         |
| 2.3.1.1. La molécule signal AHL .....                                            | 38         |
| 2.3.1.2. La synthèse d'AHL.....                                                  | 38         |
| 2.3.1.3. Réception et mécanisme d'action d'AHL.....                              | 40         |
| 2.3.1.4. Exemples de système AHL de QS.....                                      | 41         |
| 2.3.1.4.1 Cas de <i>V. fischeri</i> : .....                                      | 42         |
| 2.3.1.4.2 Cas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                             | 45         |
| 2.3.1.5. Famille de protéine Lux-solo .....                                      | 46         |
| 2.3.1.5.1 Famille LuxR-solo .....                                                | 46         |

|             |                                                                                          |                             |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 2.3.1.5.2   | Famille LuxI-solo.....                                                                   | 48                          |
| 2.3.2.      | Système de peptides.....                                                                 | 51                          |
| 2.3.3.      | Système d'Auto-inducteur 2 (AI2) .....                                                   | 53                          |
| 2.3.3.1.    | Mécanisme d'action du système AI2.....                                                   | 53                          |
| 2.3.3.2.    | Rôle de LuxS dans le métabolisme bactérien .....                                         | 55                          |
| 2.3.4.      | Autres systèmes.....                                                                     | 57                          |
| 2.3.4.1.    | AHLs non traditionnelles .....                                                           | 57                          |
| 2.3.4.1.    | Cholera <i>auto-inducteur 1</i> (CAI-1).....                                             | 57                          |
| 2.3.4.2.    | <i>Pseudomonas</i> quinolone signal (PQS) .....                                          | 58                          |
| 2.3.4.3.    | Palmitic acid methyl ester (PAME) .....                                                  | 58                          |
| 2.3.4.4.    | Diffusible signal factor (DSF).....                                                      | 59                          |
| 2.3.4.5.    | Dipeptide cyclique (CDP) ou <i>diketopiperazine</i> (DKP).....                           | 59                          |
| 2.3.4.6.    | Gamma butyrolactone (GBL) .....                                                          | 59                          |
| 2.3.4.7.    | Pyrones.....                                                                             | 60                          |
| 2.3.4.8.    | Auto-inducteur 3 (AI3).....                                                              | 60                          |
| 2.3.4.9.    | indole.....                                                                              | Erreur ! Signet non défini. |
| <b>2.4.</b> | <b>Phénotypes régulés par QS chez les bactéries .....</b>                                | <b>64</b>                   |
| 2.4.1.      | La bioluminescence.....                                                                  | 64                          |
| 2.4.2.      | La formation du biofilm .....                                                            | 67                          |
| <b>3.</b>   | <b>Bactéries biosenseurs.....</b>                                                        | <b>72</b>                   |
| <b>3.1.</b> | <b>Définition et différents types des bactéries biosenseurs .....</b>                    | <b>72</b>                   |
| <b>3.2.</b> | <b>Moyens d'utilisation des bactéries biosenseurs dans la détection d'auto-inducteur</b> | <b>78</b>                   |
| 3.2.1.      | Stries croisées .....                                                                    | 78                          |
| 3.2.2.      | Chromatographie sur couche mince (CCM).....                                              | 79                          |
| 3.2.3.      | Méthode basée sur la luminescence et la fluorescence .....                               | 80                          |
| <b>4.</b>   | <b>Quorum Quenching (QQ) .....</b>                                                       | <b>81</b>                   |
| <b>4.1.</b> | <b>Inhibition de la synthèse d'auto-inducteur .....</b>                                  | <b>81</b>                   |
| 4.1.1.      | Inhibition de la synthèse d'AHL .....                                                    | 82                          |
| 4.1.2.      | Inhibition de la synthèse d'AI2.....                                                     | 82                          |
| 4.1.3.      | Inhibition de la synthèse d'AHL et d'AI2 par inhibition de Pfs.....                      | 83                          |
| <b>4.2.</b> | <b>Inactivation d'auto-inducteur.....</b>                                                | <b>85</b>                   |
| 4.2.1.      | Dégradation et inactivation enzymatique d'AHLs .....                                     | 85                          |
| 4.2.1.1.    | AHL-Lactonases .....                                                                     | 85                          |

|             |                                                                      |            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.1.2.    | AHL-Acylases .....                                                   | 86         |
| 4.2.1.3.    | AHL-oxidoréductases.....                                             | 87         |
| 4.2.2.      | Inactivation de l'auto-inducteur 2 .....                             | 90         |
| <b>4.3.</b> | <b>Inhibition de la détection d'auto-inducteur .....</b>             | <b>91</b>  |
| 4.3.1.      | Inhibition de la détection d'AHLs.....                               | 91         |
| 4.3.1.1.    | Inhibiteurs naturels des récepteurs d'AHLs.....                      | 91         |
| 4.3.1.1.    | Inhibiteurs synthétiques des récepteurs d'AHLs.....                  | 98         |
| 4.3.2.      | Inhibition de la détection d'AI2 .....                               | 101        |
| <b>5.</b>   | <b>Contexte du travail de thèse .....</b>                            | <b>102</b> |
| <b>5.1.</b> | <b>Contexte et choix du modèle d'étude .....</b>                     | <b>102</b> |
| <b>5.2.</b> | <b><i>Shewanella woodyi</i> .....</b>                                | <b>103</b> |
| <b>5.3.</b> | <b>Le genre <i>Shewanella</i> .....</b>                              | <b>103</b> |
| <b>5.4.</b> | <b>Le QS chez les bactéries du genre <i>Shewanella</i>.....</b>      | <b>104</b> |
| <b>6.</b>   | <b>Objectifs et plan de la thèse .....</b>                           | <b>105</b> |
| <b>7.</b>   | <b>Références bibliographiques .....</b>                             | <b>107</b> |
|             | <i>Chapitre II : Matériels et Méthodes.....</i>                      | <b>133</b> |
| <b>1.</b>   | <b>Souches, plasmides et oligonucléotides .....</b>                  | <b>135</b> |
| <b>1.1.</b> | <b>Souches .....</b>                                                 | <b>135</b> |
| <b>1.2.</b> | <b>Plasmides.....</b>                                                | <b>136</b> |
| <b>1.3.</b> | <b>Oligonucléotides .....</b>                                        | <b>137</b> |
| <b>2.</b>   | <b>Culture bactérienne .....</b>                                     | <b>139</b> |
| <b>2.1.</b> | <b>Milieux de cultures et solutions.....</b>                         | <b>139</b> |
| 2.1.1.      | Nine salt solution (NSS) et vaatamen nine salt solution (VNSS) ..... | 139        |
| 2.1.2.      | Marine Broth (MB) et Marine Agar (MA).....                           | 140        |
| 2.1.3.      | <i>Sea salt</i> (SS) ou <i>Artificiel sea water</i> (ASW).....       | 141        |
| 2.1.4.      | Luria Broth (LB) .....                                               | 142        |
| 2.1.5.      | LB-MB et LB-MB agar.....                                             | 142        |
| 2.1.6.      | Tampon phosphate buffered saline (PBS) .....                         | 142        |
| <b>2.2.</b> | <b>Antibiotiques et réactifs .....</b>                               | <b>143</b> |
| 2.2.1.      | Antibiotiques.....                                                   | 143        |



|             |                                                                         |            |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.2.      | Réactifs .....                                                          | 143        |
| 2.2.2.1.    | Acide diaminopimélique (DAP).....                                       | 143        |
| 2.2.2.2.    | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal).....   | 144        |
| 2.2.2.3.    | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).....                | 144        |
| <b>2.3.</b> | <b>Culture de <i>S. woodyi</i> MS32.....</b>                            | <b>144</b> |
| <b>2.4.</b> | <b>Culture d'<i>E. coli</i>.....</b>                                    | <b>144</b> |
| <b>2.5.</b> | <b>Culture de <i>V. harveyi</i>.....</b>                                | <b>144</b> |
| <b>2.6.</b> | <b>Culture de <i>C. violaceum</i>.....</b>                              | <b>145</b> |
| <b>2.7.</b> | <b>Culture d'<i>A. tumefaciens</i> .....</b>                            | <b>145</b> |
| <b>2.8.</b> | <b>Conservation des souches bactériennes.....</b>                       | <b>145</b> |
| <b>3.</b>   | <b>Techniques de biologie moléculaire.....</b>                          | <b>146</b> |
| <b>3.1.</b> | <b>Mutation des gènes <i>luxR</i>, <i>luxI</i> et <i>luxS</i>.....</b>  | <b>146</b> |
| 3.1.1.      | Sous clonage .....                                                      | 146        |
| 3.1.1.1.    | Construction de plasmide recombinant pBSK $\Delta luxR$ .....           | 146        |
| 3.1.1.2.    | Transformation et sélection des souches transformées .....              | 148        |
| 3.1.2.      | Clonage .....                                                           | 148        |
| 3.1.3.      | Intégration de plasmides dans le génome de <i>S. woodyi</i> .....       | 149        |
| 3.1.4.      | Sélection des souches mutantes.....                                     | 149        |
| <b>3.2.</b> | <b>Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR) .....</b>           | <b>151</b> |
| 3.2.1.      | Extraction de l'ARN .....                                               | 151        |
| 3.2.2.      | Traitement à la DNase de l'ARN.....                                     | 151        |
| 3.2.3.      | Synthèse d'ADNc et réalisation de qPCR .....                            | 152        |
| 3.2.4.      | Courbe d'étalonnage et traitement des résultats .....                   | 152        |
| <b>4.</b>   | <b>Techniques de microbiologie et de biologie cellulaire .....</b>      | <b>153</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Suivi de croissance et de luminescence de <i>S. woodyi</i> .....</b> | <b>153</b> |
| 4.1.1.      | Cultures planctoniques .....                                            | 153        |
| 4.1.2.      | Cultures sessiles.....                                                  | 153        |
| <b>4.2.</b> | <b>Tests de mobilité.....</b>                                           | <b>153</b> |
| 4.2.1.      | <i>Swimming</i> .....                                                   | 154        |
| 4.2.2.      | <i>Swarming</i> .....                                                   | 154        |
| <b>4.3.</b> | <b>Tests d'adhésion et de la formation du biofilm .....</b>             | <b>154</b> |

|              |                                                                                                                                 |            |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.1.       | Protocole du test d'adhésion.....                                                                                               | 155        |
| 4.3.2.       | Mesure de formation de biofilm au cristal violet .....                                                                          | 155        |
| <b>4.4.</b>  | <b>Imagerie de biofilms de <i>S. woodyi</i> par microscopie à balayage laser confocal (CLSM) .....</b>                          | <b>156</b> |
| <b>4.5.</b>  | <b>Co-culture d'amibes et de bactéries.....</b>                                                                                 | <b>157</b> |
| 4.5.1.       | Cultures amibiennes .....                                                                                                       | 157        |
| 4.5.2.       | Cultures bactériennes .....                                                                                                     | 158        |
| 4.5.3.       | Préparation des microplaques.....                                                                                               | 158        |
| 4.5.4.       | Protocole de marquage .....                                                                                                     | 158        |
| 4.5.5.       | Microscopie confocal.....                                                                                                       | 159        |
| <b>4.6.</b>  | <b>Détection d'AHLs synthétisées par <i>S. woodyi</i>.....</b>                                                                  | <b>159</b> |
| 4.6.1.       | Détection d'AHLs de <i>S. woodyi</i> par BB475.....                                                                             | 160        |
| 4.6.1.1.     | Préparation des surnageants de <i>S. woodyi</i> .....                                                                           | 160        |
| 4.6.1.2.     | Protocole d'induction de la luminescence de BB475 .....                                                                         | 160        |
| 4.6.2.       | Détection d'AHLs de <i>S. woodyi</i> par CV026 et A136 .....                                                                    | 160        |
| 4.6.2.1.     | 1 <sup>ère</sup> approche : Stries en T sur boîte VNSS agar .....                                                               | 160        |
| 4.6.2.2.     | 2 <sup>ème</sup> approche : cultures séparées de <i>S. woodyi</i> et des biosenseurs.....                                       | 161        |
| 4.6.2.3.     | Détection des AHLs à partir des extraits bactériens.....                                                                        | 162        |
| <b>4.7.</b>  | <b>Détection d'A12 synthétisé par <i>S. woodyi</i>.....</b>                                                                     | <b>163</b> |
| <b>4.8.</b>  | <b>Effet des AHLs exogènes sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm de <i>S. woodyi</i>.....</b>              | <b>163</b> |
| 4.8.1.       | Effet des AHLs exogènes sur la luminescence .....                                                                               | 164        |
| 4.8.2.       | Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion et la formation du biofilm .....                                                         | 165        |
| <b>4.9.</b>  | <b>Effet d'A12 exogène sur la luminescence de <i>S. woodyi</i>.....</b>                                                         | <b>165</b> |
| <b>4.10.</b> | <b>Effet des molécules QSI commerciales sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm de <i>S. woodyi</i>.....</b> | <b>166</b> |
| <b>4.11.</b> | <b>Extraction des AHLs .....</b>                                                                                                | <b>166</b> |
| <b>4.12.</b> | <b>Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) .....</b>                                                | <b>167</b> |
| <b>5.</b>    | <b>Références bibliographiques .....</b>                                                                                        | <b>169</b> |
|              | <i>Chapitre III : <i>S. woodyi</i> sécrète la C8-HSL pour réguler sa bioluminescence mais pas son biofilm.....</i>              | <i>171</i> |
| <b>1.</b>    | <b>Introduction.....</b>                                                                                                        | <b>173</b> |

|                                                                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2. Résultats préalables</b> .....                                                                                           | <b>174</b> |
| <b>2.1. Conditions de croissance de <i>S. woodyi</i></b> .....                                                                 | <b>174</b> |
| <b>2.2. Conditions de l'adhésion et de la formation de biofilm chez <i>S. woodyi</i></b> .....                                 | <b>175</b> |
| <b>2.3. Conditions d'utilisation des antibiotiques</b> .....                                                                   | <b>178</b> |
| <b>3. Article</b> .....                                                                                                        | <b>180</b> |
| <b>4. Résultats complémentaires et supplémentaires</b> .....                                                                   | <b>227</b> |
| <b>4.1. Conditions sessiles de culture de <i>S. woodyi</i></b> .....                                                           | <b>227</b> |
| <b>4.2. QS chez <i>S. woodyi</i></b> .....                                                                                     | <b>229</b> |
| 4.2.1. Analyse de LuxI.....                                                                                                    | 229        |
| 4.2.2. Analyse de LuxR.....                                                                                                    | 230        |
| <b>4.3. QS et phénotypes associés à la formation du biofilm chez <i>S. woodyi</i></b> .....                                    | <b>232</b> |
| 4.3.1. Effet d'inactivation de QS sur la formation du biofilm chez <i>S. woodyi</i> .....                                      | 232        |
| 4.3.2. Effet d'inactivation de QS sur la mobilité de <i>S. woodyi</i> .....                                                    | 237        |
| <b>4.4. QS et interaction bactéries-amibes</b> .....                                                                           | <b>238</b> |
| 4.4.1. Effet d'inactivation de QS sur l'interaction <i>S. woodyi</i> - <i>A. castellanii</i> .....                             | 238        |
| <b>5. Conclusions et discussion</b> .....                                                                                      | <b>241</b> |
| <b>6. Références Bibliographiques</b> .....                                                                                    | <b>247</b> |
| <i>Chapitre IV: Caractérisation du système AI2 de <i>S. woodyi</i> et test de molécules anti-QS</i> .....                      | <b>253</b> |
| <b>1. Introduction</b> .....                                                                                                   | <b>255</b> |
| <b>2. Caractérisation du système AI2 de <i>S. woodyi</i></b> .....                                                             | <b>256</b> |
| <b>2.1. Recherche des gènes impliqués dans la synthèse et la détection d'AI2 dans le génome de <i>S. woodyi</i> MS32</b> ..... | <b>256</b> |
| <b>2.2. Synthèse et réception d'AI2 par <i>S. woodyi</i></b> .....                                                             | <b>260</b> |
| <b>2.3. Conclusions et discussions</b> .....                                                                                   | <b>263</b> |
| <b>3. Test de molécules anti-QS</b> .....                                                                                      | <b>265</b> |
| <b>3.1. Introduction</b> .....                                                                                                 | <b>265</b> |
| <b>3.2. Choix des molécules QSI</b> .....                                                                                      | <b>266</b> |

|                                             |            |
|---------------------------------------------|------------|
| <b>3.3. Résultats</b> .....                 | <b>268</b> |
| <b>3.4. Conclusion</b> .....                | <b>273</b> |
| <b>4. Références Bibliographiques</b> ..... | <b>274</b> |
| <i>Conclusion générale</i> .....            | <b>279</b> |
| <b>1. Conclusion générale</b> .....         | <b>281</b> |
| <b>2. Références bibliographiques</b> ..... | <b>287</b> |



## Liste des illustrations – Figures

---

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien. ....                                                                                          | 29 |
| Figure 2. Représentation schématique de la signalisation c-di-GMP. ....                                                                                                    | 34 |
| Figure 3. Mécanisme général du QS bactérien. ....                                                                                                                          | 37 |
| Figure 4. Structure d'une molécule d'AHL. ....                                                                                                                             | 38 |
| Figure 5. Schéma de la biosynthèse d'une AHL à partir du SAM par une protéine homologue de LuxI .....                                                                      | 40 |
| Figure 6. Structure de la 3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL.....                                                                                                                   | 42 |
| Figure 7. Mécanisme de QS chez <i>V. fischeri</i> . ....                                                                                                                   | 43 |
| Figure 8. Modèle de la transduction du signal C <sub>8</sub> -HSL par LuxN chez <i>V. fischeri</i> . ....                                                                  | 44 |
| Figure 9. Les différents systèmes de QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                                                                           | 46 |
| Figure 10. Rôles possibles de LuxR-solo dans le cas de la présence ou l'absence de la production d'AHLs. ....                                                              | 47 |
| Figure 11. Alignement des protéines putatives LuxI-solo chez <i>Sphingobium</i> sp. KK2 et <i>Sphingobium chinhatense</i> IP26. ....                                       | 49 |
| Figure 12. Modèle générale de système de communication QS via des peptides chez les bactéries Gram+ . ....                                                                 | 51 |
| Figure 13. Schéma du système Agr chez <i>S. aureus</i> .....                                                                                                               | 52 |
| Figure 14. Structures des peptides cycliques utilisés par <i>S. aureus</i> et <i>E. faecalis</i> . ....                                                                    | 53 |
| Figure 15. Schéma de la biosynthèse d'AI2 à partir de la SAH sous l'action de Pfs et LuxS. ....                                                                            | 54 |
| Figure 16. Structure des molécules d'AI2 identifiées chez les <i>Vibrionaceae</i> (à gauche) et les <i>Enterobacteriaceae</i> (à droite).....                              | 54 |
| Figure 17. Transduction du signal AI-2 chez les <i>Enterobacteriaceae</i> (à gauche, en rouge) et les <i>Vibrionaceae</i> (à droite, en bleu). ....                        | 55 |
| Figure 18. Les deux voies d'hydrolyse de la substance toxique SAH soit par SAH hydrolase soit par Pfs et LuxS via l'AMC (Activated methyl cycle) en produisant l'AI2. .... | 56 |
| Figure 19. Structures moléculaires des AHLs non traditionnelles. ....                                                                                                      | 57 |
| Figure 20. Structure moléculaire de CAI-1 chez <i>V. cholerae</i> . ....                                                                                                   | 58 |
| Figure 21. Structure moléculaire de PQS.....                                                                                                                               | 58 |
| Figure 22. Structure moléculaire de 3-OH-PAME.....                                                                                                                         | 59 |
| Figure 23. Structure moléculaire de DSF.....                                                                                                                               | 59 |
| Figure 24. Structure moléculaire du Gamma butyrolactone. ....                                                                                                              | 60 |
| Figure 25. Structures moléculaires de l'indole, l'acide indole-3-acétique et tryptophane. ....                                                                             | 61 |

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 26. Exemples des processus bactériens régulés par QS chez les bactéries.....                                                                                                | 64  |
| Figure 27. Schema représentant la réaction de la luminescence catalysée par la luciférase....                                                                                      | 65  |
| Figure 28. Organisation de l'opéron <i>lux</i> chez les bactéries luminescentes.....                                                                                               | 65  |
| Figure 29. Les trois systèmes de QS présentent chez <i>V. harveyi</i> .....                                                                                                        | 66  |
| Figure 30. Présentation des systèmes QS chez <i>V. cholerae</i> .....                                                                                                              | 70  |
| Figure 31. Modèle simplifié de l'interaction entre QS et c-di-GMP dans la régulation de l'expression génétique chez <i>V. cholerae</i> .....                                       | 71  |
| Figure 32. Différentes techniques utilisées pour détecter un AI par une bactérie biosenseur.                                                                                       | 78  |
| Figure 33. Technique des stries croisées dans le cas d'une détection d'AHL en utilisant le CV026 (à gauche ; coloration violette) et l'A136 (à droite ; coloration bleue). .....   | 79  |
| Figure 34. Techniques de la détection d'AHLs utilisées quand la bactérie test ne croit pas sur le même milieu que le biosenseur. ....                                              | 79  |
| Figure 35. Exemple de la chromatographie en couche mince avec <i>C. violaceum</i> CV026 (a) et <i>A. tumefaciens</i> pDZLR4 (b) .....                                              | 80  |
| Figure 36. Les principales stratégies du <i>Quorum Quenching</i> .....                                                                                                             | 81  |
| Figure 37. La structure moléculaire de (A) S-adénosylhomocystéine, (B) triclosan et (C) naringinine.....                                                                           | 82  |
| Figure 38. les voies de synthèse d'AHL et d'AI2 à partir de SAM et l'implication de Pfs dans ces deux voies de synthèse. ....                                                      | 83  |
| Figure 39. Implication de Pfs dans la voie de la synthèse de polyamine.....                                                                                                        | 84  |
| Figure 40. Structure moléculaire de (A) 5'-(p-nitrophenyl)thioadenosine, (B) immuciline A, (C) sinefugine.....                                                                     | 84  |
| Figure 41. Mécanismes de dégradation ou d'inactivation d'AHLs par les enzymes de QQ : AHL-acylase, AHL-lactonase et oxydoréductase. ....                                           | 85  |
| Figure 42. Inhibition de la mobilité de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 par l'expression d' <i>aiiD</i> . ....                                                                           | 87  |
| Figure 43. Inhibition de la réponse QS médiée par AI2 sous l'action de Lsrk .....                                                                                                  | 90  |
| Figure 44. Structure moléculaire proche d'AHL des quelques inhibiteurs naturels de la détection d'AHLs. ....                                                                       | 92  |
| Figure 45. Structure moléculaire des analogues d'AHLs synthétisés par Geske <i>et al.</i> .....                                                                                    | 98  |
| Figure 46. Analogues d'AI2 à base d'acide phényle-boronique .....                                                                                                                  | 101 |
| Figure 47. Analogues d'AI2 à base de pyrogallol.....                                                                                                                               | 101 |
| Figure 48. Carte génétique du plasmide pBSK. ....                                                                                                                                  | 146 |
| Figure 49. Représentation schématique de l'amplification des régions bordantes du gène <i>luxR</i> (A) et du gène <i>luxI</i> (B) à partir d'ADNg de <i>S. woodyi</i> par PCR..... | 147 |

|                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 50. Configurations chromosomiques possibles après l'échange allélique avec le plasmide contenant les séquences bordantes du gène cible. ....                                                    | 150 |
| Figure 51. Technique de détection d'AHL par stries T croisées.....                                                                                                                                     | 161 |
| Figure 52. Technique de détection d'AHLs par contact de deux géloses différentes.....                                                                                                                  | 162 |
| Figure 53. Technique de détection d'AHLs par les biosenseurs à partir d'un extrait bactérien. ....                                                                                                     | 163 |
| Figure 54. Représentation schématique du protocole d'extraction des AHLs à partir de solvants organiques. ....                                                                                         | 167 |
| Figure 55. Suivi de la croissance de <i>S. woodyi</i> en conditions planctoniques dans de VNSS, MB et ASW.....                                                                                         | 174 |
| Figure 56. Suivi d'adhésion de <i>S. woodyi</i> en ASW. ....                                                                                                                                           | 176 |
| Figure 57. Suivi de la formation de biofilm de <i>S. woodyi</i> en VNSS et ASW.....                                                                                                                    | 177 |
| Figure 58. Sensibilité de <i>S. woodyi</i> vis-à-vis de différents antibiotiques : streptomycine, gentamycine, ampicilline, chloramphénicol et kanamycine. ....                                        | 179 |
| Figure 59. Suivi de la croissance et de la luminescence de <i>S. woodyi</i> en conditions sessiles dans du VNSS, MB et ASW. ....                                                                       | 228 |
| Figure 60. Alignement protéique de LuxI chez <i>S. woodyi</i> (Swoo_2998). ....                                                                                                                        | 229 |
| Figure 61. Alignement protéique des LuxR de <i>S. woodyi</i> .....                                                                                                                                     | 231 |
| Figure 62. Effet des mutations <i>luxI</i> et <i>luxR</i> sur la formation de biofilm chez <i>S. woodyi</i> dans les milieux VNSS, ASW, MB. ....                                                       | 233 |
| Figure 63. Effet des mutations $\Delta luxR$ ou $\Delta luxI$ et de l'ajout de la C <sub>8</sub> -HSL sur la formation du biofilm. ....                                                                | 234 |
| Figure 64. Effet des mutations et de l'ajout de C <sub>8</sub> -HSL sur la structure tridimensionnelle du biofilm formé par <i>S. woodyi</i> dans les milieux VNSS, MB et ASW à 48 h d'incubation..... | 236 |
| Figure 65. Effet des mutations sur le <i>swimming</i> et le <i>swarming</i> de <i>S. woodyi</i> . ....                                                                                                 | 237 |
| Figure 66. Effet des mutations sur l'interaction <i>S. woodyi</i> et <i>A. castellanii</i> .....                                                                                                       | 239 |
| Figure 67. Représentation schématique de deux profils de l'opéron <i>lux</i> rencontrés chez les bactéries luminescentes. ....                                                                         | 242 |
| Figure 68. Modèle représentant le système AHL chez <i>S. woodyi</i> .....                                                                                                                              | 246 |
| Figure 69. L'AMC et la synthèse d'AI2 au sein d'une cellule bactérienne. ....                                                                                                                          | 257 |
| Figure 70. Transduction du signal AI-2 chez les <i>Enterobacteriaceae</i> (à gauche, en rouge) et les <i>Vibrionaceae</i> (à droite, en bleu). ....                                                    | 259 |
| Figure 71. Activité LuxS de <i>S. woodyi</i> .....                                                                                                                                                     | 260 |
| Figure 72. Effet d'AI2 exogène sur la luminescence de <i>S. woodyi</i> .....                                                                                                                           | 261 |



|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 73. Effet des molécules commerciales utilisées sur la croissance de <i>S. woodyi</i> .....                                                     | 268 |
| Figure 74. Effet des molécules commerciales utilisées sur la luminescence de <i>S. woodyi</i> ....                                                    | 269 |
| Figure 75. Effet des molécules de pyrogallol (Mol 1 et 2) et d'acide boronique (Mol 3 et 4) sur l'adhésion de <i>S. woodyi</i> . .....                | 270 |
| Figure 76. Effet des Molécules de pyrogallol (Mol 1 et 2) et d'acide boronique (Mol 3 et 4) sur la formation du biofilm chez <i>S. woodyi</i> . ..... | 270 |

## Liste des illustration – Tableaux

---

|                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1. Fonctions de LuxR-solo chez quelques bactéries.....                                                                                                                      | 50  |
| Tableau 2. Les autres systèmes ou signaux QS trouvés dans l’environnement marin et terrestre.....                                                                                   | 62  |
| Tableau 3. Différentes implication du QS dans la formation de biofilm chez les bactéries. ...                                                                                       | 67  |
| Tableau 4. Caractéristiques de quelques biosenseurs utilisés pour l’induction du QS. ....                                                                                           | 74  |
| Tableau 5. Les trois familles d’enzymes qui dégradent ou inactivent les AHLs .....                                                                                                  | 87  |
| Tableau 6. Quelques inhibiteurs naturels d’AHLs. ....                                                                                                                               | 93  |
| Tableau 7. Quelques inhibiteurs synthétiques de la détection d’AHLs. ....                                                                                                           | 99  |
| Tableau 8. Liste des bactéries utilisées dans ce travail. ....                                                                                                                      | 135 |
| Tableau 9. Liste des biosenseurs utilisés dans ce travail.....                                                                                                                      | 135 |
| Tableau 10. Liste des plamides utilisés dans ce travail.....                                                                                                                        | 136 |
| Tableau 11. Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude. ....                                                                                                              | 137 |
| Tableau 12. Composition chimique du milieu VNSS.....                                                                                                                                | 139 |
| Tableau 13. Composition chimique de MB. ....                                                                                                                                        | 140 |
| Tableau 14. Composition chimique de <i>Sea Salt</i> .....                                                                                                                           | 141 |
| Tableau 15. Composition chimique de LB.....                                                                                                                                         | 142 |
| Tableau 16. Composition chimique du PBS. ....                                                                                                                                       | 143 |
| Tableau 17. Les antibiotiques utilisés dans cette étude.....                                                                                                                        | 143 |
| Tableau 18. Molécules d’AHLs utilisées dans cette étude.....                                                                                                                        | 164 |
| Tableau 19. Les molécules QSI utilisées dans cette étude.....                                                                                                                       | 166 |
| Tableau 20. Les acides aminés trouvés dans les domaines N-terminal et C-terminal des LuxR de <i>S. woodyi</i> .....                                                                 | 232 |
| Tableau 21. Les molécules QSI sélectionnées. ....                                                                                                                                   | 267 |
| Tableau 22. Effet des molécules appartenant aux familles de pyrogallol et d’acide boronique sur la luminescence, l’adhésion et la formation du biofilm chez <i>S. woodyi</i> . .... | 271 |



*Chapitre I*  
*Revue bibliographique*



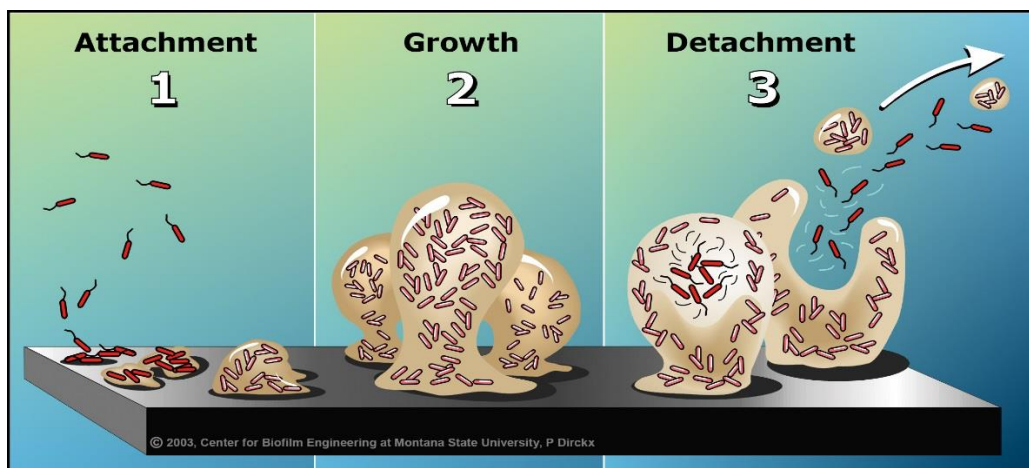
## 1. Le biofilm en milieu marin

### 1.1. Définition

Le biofilm peut être défini comme une communauté bactérienne adhérente sur une surface, entourée par une matrice extracellulaire appelée substance polymérique extracellulaire (EPS). Il est considéré comme le mode de vie le plus fréquent dans le monde bactérien (Pasmore and Costerton, 2003). En milieu marin, le biofilm est constitué de microorganismes tels que les bactéries, les diatomées et les protozoaires, qui finissent généralement par être recouvert de macroorganismes tels que les balanes, les algues...etc. constituant le biofouling. Le biofouling est défini comme un phénomène naturel de colonisation spontanée des surfaces biotiques et abiotiques telles que les coques de bateaux, des canalisations et des installations immergées (Salta *et al.*, 2013).

### 1.2. Etapes de la formation du biofilm

Toute surface immergée peut être rapidement colonisée par les bactéries en suspension dans le milieu aqueux. La formation de biofilm dépend de nombreux facteurs et conditions environnementales. Il n'existe pas un modèle universel de la formation du biofilm mais les étapes clés comme l'adhésion réversible et irréversible des bactéries à la surface, la maturation et le détachement partiel ou la dispersion des bactéries dans ce processus semblent être conservées chez de nombreuses espèces bactériennes (O'Toole *et al.*, 2000; Hinsa and O'Toole, 2006). Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 1.



**Figure 1.** Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien.

(1) attachement réversible et irréversible des cellules à la surface ; (2) Croissance et maturation du biofilm : multiplication cellulaire et synthèse d'EPS ; (3) dispersion des cellules du biofilm (d'après P. Dircks, center for biofilm engineering, Montana state university).

### 1.2.1. Conditionnement de surface et adhésion des bactéries

Le conditionnement de surface décrit pour la première fois par Loeb et Neihof en 1975 (Loeb and Neihof, 1975) implique qu'un support solide immergé est le siège de l'adsorption de molécules organiques, molécules inorganiques et d'ions, ce qui entraîne une modification des propriétés physico-chimiques de la surface, formant ainsi un micro-niche riche en nutriments, favorable alors à l'adhésion stable des bactéries.

L'adhésion des bactéries sur une surface nécessite d'abord un déplacement de ces bactéries vers la surface à coloniser. Cette étape se fait généralement grâce à des appendices générateurs de mouvements tels que les flagelles ou les pili (Ha and O'Toole, 2015). Une fois sur la surface, les bactéries établissent des interactions faibles avec cette surface conditionnée comme les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals. Ces interactions dépendent de plusieurs facteurs tels que le flux et la distance entre les bactéries et la surface. L'attachement des bactéries est facilité si les conditions de flux sont proches de zéro et si la distance entre les bactéries et la surface est plus petite que un nm. Dans ce cas des interactions spécifiques se mettent en place comme les liaisons hydrogènes et les ponts cationiques (Donlan, 2002). À ce stade les bactéries peuvent se détacher rapidement de la surface et retrouver leur état planctonique sous l'action de contraintes hydrodynamiques. Pour cela cette étape est considérée comme une étape d'adhésion réversible (Haras, 2005).

L'adhésion devient irréversible lorsque des interactions covalentes fortes sont établies entre la bactéries et la surface, grâce aux macromolécules de surfaces bactériennes telles que les polysaccharides, les protéines ou les lipopolysaccharides (Haras, 2005). Montgomery et Kirchman ont démontré en 1993 (Montgomery and Kirchman, 1993) que la colonisation des particules chitineuse par *Vibrio harveyi* se fait grâce aux protéines membranaires qui peuvent lier spécifiquement la chitine. D'autre part, il a été démontré que la colonisation des matériaux biomédicaux par *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus* nécessite l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) impliquée dans l'agrégation des cellules entre elles (Cramton *et al.*, 1999; Mack *et al.*, 2000). En outre, plusieurs auteurs ont rapporté le rôle des appendices extracellulaires dans cette étape d'attachement irréversible tels que les flagelles et les pili de type I et IV qui jouent un rôle important dans l'interaction bactéries-surface d'une part et qui aident les bactéries d'autre part à se déplacer afin de trouver une niche favorable à leur développement (Pratt and Kolter, 1998; Davey and O'toole, 2000; Hall-Stoodley and Stoodley, 2002). Dans l'exemple de l'étude effectuée par Paranjpye et Strom en 2005 (Paranjpye and Strom, 2005), il a été démontré que chez la bactérie marine pathogène *V.*

*vulnificus*, l'inactivation du gène codant pour la piline de type IV (PilA), homologue des pilines de plusieurs bactéries pathogènes comme *V. cholerae* (PilA) ou *Pseudomonas aeruginosa* (PilA), réduit la capacité de *V. vulnificus* à former des biofilms et diminue significativement l'adhérence de cette bactérie aux cellules épithéliales.

### 1.2.2. Maturation du biofilm

Un biofilm mature est une structure tridimensionnelle entourée par une matrice extracellulaire composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) : protéines, polysaccharides, acides nucléiques, lipides et autres composants cellulaires. Cette matrice forme une barrière protectrice qui protège les cellules en biofilm contre plusieurs menaces que peuvent représenter par exemple les bactériophages, les amibes et certains bactéricides conventionnels comme les antibiotiques (Ha and O'Toole, 2015). C'est après l'adhésion irréversible que les bactéries commencent à se multiplier en synthétisant et développant la structure de leur EPS formant ainsi des colonies qui recouvrent tout ou partie de la surface. Cette étape dépend de plusieurs facteurs tels que les microorganismes en présence (espèces, souches...), leur capacité à communiquer entre eux [système de communication de type quorum sensing (QS)], les conditions du milieu (température, durée, substrats...) et les propriétés de la surface (O'Toole *et al.*, 2000; Branda *et al.*, 2005).

### 1.2.3. Dispersion du biofilm

La dernière étape du développement du biofilm est la dispersion de cellules dans l'environnement après leur détachement du biofilm. Cette dispersion est une partie essentielle du cycle de ce mode de vie où elle permet aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces afin de redévelopper un nouveau biofilm (Kaplan, 2010). En général, les mécanismes de dispersion du biofilm peuvent être divisés en deux grandes catégories : ceux correspondant à la dispersion active et ceux à la dispersion passive. La dispersion active est basée sur des mécanismes initiés par les bactéries elles-mêmes alors que la dispersion passive est médiée par des forces extérieures comme les forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques (Lawrence *et al.*, 2002). Plusieurs facteurs sont impliqués dans le processus complexe de dispersion du biofilm tels que les signaux environnementaux (diminution de nutriments et d'oxygène...), les systèmes de QS, et la production par les bactéries d'enzymes extracellulaires qui vont dégrader les composants de la matrice du biofilm facilitant ainsi sa dissociation (Kaplan, 2010) telle que l'alginate lyase de *P. aeruginosa*, capable de dégrader



l'alginate (un composant très abondant dans l'EPS du biofilm formé par *P. aeruginosa*) (Boyd and Chakrabarty, 1994).

### 1.3. Conséquences de la formation du biofilm marin

Les biofilms sont présents dans toutes les niches écologiques et colonisent des surfaces très diverses, biotiques ou abiotiques. La grande majorité des scientifiques s'accorde à dire que les biofilms constituent le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature, alors que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces. Les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs allant du secteur sanitaire à l'environnement marin (Watnick and Kolter, 2000; Kolter and Greenberg, 2006). En milieu marin, le phénomène de biofouling se retrouve évidemment sur les coques des bateaux, mais aussi sur de nombreuses autres structures telles que les pipelines, les installations liées à l'aquaculture, les structures portuaires ou encore toutes sortes de matériels scientifiques immergés. Le cas des navires notamment a des conséquences tant d'un point de vue économique qu'écologique. En effet, la présence du biofilm ou biofouling sur les coques des navires augmente la rugosité de celle-ci et diminue alors leur hydrodynamisme, ce qui amène à une diminution de la vitesse de navigation et de la maniabilité (Yebrá et al., 2004). Pour y remédier, une augmentation de la vitesse de navigation s'avère nécessaire, ce qui conduit généralement à une élévation de la consommation de carburant. Cette consommation supplémentaire de carburant a pour conséquence une augmentation du coût opérationnel des navires et une émission élevée de composés nocifs et de déchets toxiques dans la mer et dans l'atmosphère (Yebrá et al., 2004; Schultz et al., 2011). De plus, la présence de biofilm peut, au cours de la navigation, entraîner une délocalisation d'espèces non autochtones et ainsi perturber les écosystèmes (Yebrá et al., 2004).

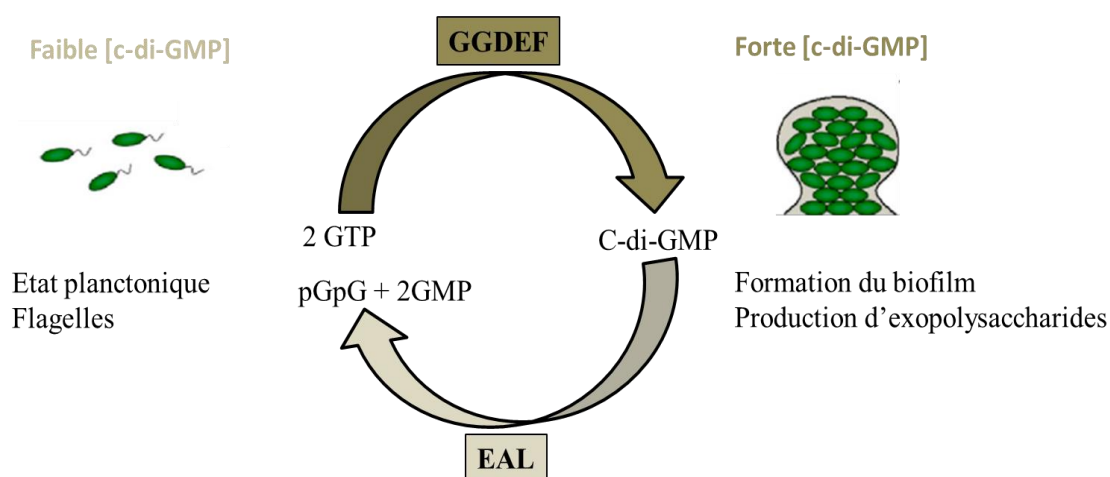
### 1.4. Régulation génétique de la formation du biofilm

La formation du biofilm est un processus hautement régulé et pour lequel la régulation diffère d'un genre bactérien à l'autre. Les principaux régulateurs du biofilm bactérien selon les connaissances actuelles sont le *quorum sensing* (QS), le diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) et les petits ARNs (small ARN : sARN) (Wolska et al., 2016).

Le QS est considéré comme un système de communication bactérien, basé sur des petites molécules signal autoproduites appelées auto-inducteurs (AI). A forte densité cellulaire, les auto-inducteurs atteignent une concentration seuil qui déclenche leur détection par les bactéries qui en réponse activent ou répriment certains gènes cibles y compris des

gènes impliqués dans la formation du biofilm. Ces gènes peuvent constituer jusqu'à 10% du génome bactérien (Wagner *et al.*, 2003). Les systèmes QS jouent un rôle principal dans la régulation du développement et dans la dispersion du biofilm chez plusieurs bactéries telles que *P. aeruginosa* (De Kievit *et al.*, 2001), *Serratia liquefaciens* MG1 (Labbate *et al.*, 2004), *V. anguillarum* (You *et al.*, 2007) et *Shewanella baltica* (Wang *et al.*, 2017) L'interférence avec cette voie de communication par des molécules inhibitrices amènerait dans la plupart des cas à une inhibition de la formation du biofilm (Dobretsov *et al.*, 2011). En revanche un rôle inhibiteur de QS sur la formation du biofilm a été rapporté chez plusieurs bactéries pathogènes comme *S. epidermidis* (Xu *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2006) et *V. cholerae* (Waters *et al.*, 2008). Dans ces cas, l'interférence avec les systèmes QS amène à une augmentation de la formation du biofilm.

La voie de signalisation du c-di-GMP est également une voie impliquée dans la formation du biofilm. Le c-di-GMP est reconnu comme un messager secondaire bactérien universel du fait de l'identification des enzymes de synthèse (protéines qui contiennent un domaine à activité diguanylate cyclase, GGDEF) et de dégradation (protéines qui contiennent un domaine à activité phosphodiesterase, EAL) de ce signal chez la plupart des phylums bactériens (Römling *et al.*, 2013; Chou and Galperin, 2016). Après sa liaison avec une variété de récepteurs cellulaires, le c-di-GMP régule l'expression génétique bactérienne et contrôle alors plusieurs processus tels que la capacité de la bactérie à interagir avec une surface abiotique, la motilité et la transition bactérienne de l'état planctonique à l'état sessile...(Römling *et al.*, 2013). Le c-di-GMP contrôle la formation de biofilm par la régulation des plusieurs facteurs importants pour le développement et la structuration de biofilm tels que la synthèse d'exopolysaccharides, des pili adhésifs et des adhésines, la sécrétion d'ADN extracellulaire et la motilité (Cotter and Stibitz, 2007). Généralement, une forte concentration intracellulaire de c-di-GMP induit la biosynthèse des structures adhésives et la production d'exopolysaccharides, ce qui favorise la formation de biofilm (Figure 2). Alors qu'une faible concentration de c-di-GMP induit une forme bactérienne planctonique (Figure 2) (Hengge, 2009). L'interférence avec la voie de signalisation du c-di-GMP conduisant à une diminution de la concentration en c-di-GMP et aboutit alors à une inhibition de la formation du biofilm comme cela a été montré chez, *Shewanella oneidensis* MR-1 (Chao *et al.*, 2013), *Yersinia pestis* (Amikam and Galperin, 2006), *V. fischeri* (Visick *et al.*, 2007), *Agrobacterium tumefaciens* ou encore *P. aeruginosa* (Ha and O'Toole, 2015).



**Figure 2.** Représentation schématique de la signalisation c-di-GMP.

Les protéines à domaine GGDEF et EAL synthétisent et dégradent le c-di-GMP respectivement. Un taux élevé du c-di-GMP favorise la formation du biofilm tandis qu'un taux faible favorise l'état cellulaire planctonique.

Enfin, la régulation du biofilm chez les bactéries peut se faire par des petits ARN régulateurs non-codants qui peuvent moduler d'une manière post transcriptionnelle l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm. Les ARN régulateurs régulent l'expression des gènes en se liant à des ARNm ou à des protéines, ce qui entraîne la modulation de la stabilité des ARNm, de la traduction et/ou de la liaison d'une protéine à l'ADN (Chambers and Sauer, 2013). Les bactéries utilisent les ARN régulateurs comme un élément clé dans le contrôle des processus de développement cellulaire de réponse au changement de différentes conditions environnementales et de formation du biofilm (Beisel and Storz, 2010). Par exemple, OmrA et OmrB sont deux sARN qui inhibent la formation du biofilm chez *Escherichia coli* en interférant avec la traduction de l'ARNm codant un facteur transcriptionnel CsgD, impliqué dans la régulation de la synthèse des structures adhésives (curli) nécessaires pour l'adhésion et la formation du biofilm chez cette bactérie (Holmqvist et al., 2010).

La régulation de la formation du biofilm par ces différentes voies est complexe car ces voies de régulation sont interconnectées et régulent des processus complexes dont les mécanismes sont différents d'une bactérie à une autre. Par exemple, plusieurs auteurs ont rapporté le rôle stimulateur joué par QS dans la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (Davies et al., 1998; De Kievit et al., 2001; Ishida et al., 2007). En revanche, Ueda et Wood (Ueda and Wood, 2009) ont montré que le QS peut inhiber la formation du biofilm chez cette bactérie par la stimulation de l'expression d'une phosphatase nommé TpbA. TpbA inactive par déphosphorylation une protéine TpbB qui synthétise le c-di-GMP. L'inactivation de TpbB inhibe la synthèse de c-di-GMP, ce qui a comme conséquence la diminution de l'expression

des gènes régulés par cette voie de signalisation tels que l'opéron *peIABCEFG* impliqué dans la sécrétion d'EPS. Ceci se traduit par l'inhibition de la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. Un autre exemple sur la complexité et l'interconnexion entre ces différentes voies chez *V. cholerae* sera détaillé dans la partie [2.4.2](#) (Page 67).

## 2. Quorum sensing

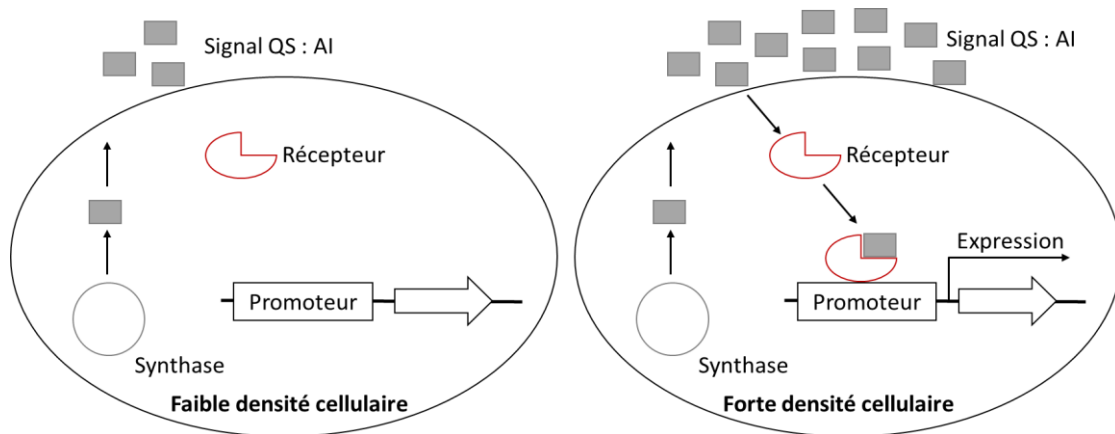
### 2.1. Définition

Le QS est un mode de communication bactérien qui permet aux bactéries de synchroniser leurs expressions génétiques en fonction de leurs densités cellulaires via la production, la libération, l'accumulation et la détection des petites molécules signal appelées auto-inducteurs. Il est impliqué dans plusieurs processus ou comportements bactériens y compris la synthèse de facteurs de virulence, la résistance aux antibiotiques, la luminescence et la production d'exopolysaccharides nécessaires pour l'adhésion et la formation de biofilm (Van Houdt *et al.*, 2004; Bagert *et al.*, 2016). Les bactéries utilisent alors le QS afin d'optimiser l'expression d'une activité bactérienne coûteuse en énergie effectuée par un nombre suffisant de cellules dans la colonie (Diggle *et al.*, 2007). De plus, le QS permet à une population bactérienne de monter une réponse coopérative qui améliore l'accès aux nutriments ou aux niches environnementales spécifiques et qui favorise la défense collective contre des procaryotes concurrents favorisant ainsi la survie et la lutte contre les menaces environnementales (Williams *et al.*, 2007).

Ce processus a été découvert en 1970 par la description d'un système de communication qui contrôle la luminescence chez la bactérie marine *V. fischeri* vivant en association avec un calmar hawaïen, *Euprymna scolopes* (Nealson *et al.*, 1970). L'émission de bioluminescence permet au calmar de se camoufler afin d'échapper à ses prédateurs en utilisant la lumière émise par la bactérie comme contre-éclairage pour masquer son ombre.

### 2.2. Mécanisme général du QS bactérien

Un système QS implique 1) un gène codant pour une protéine synthase, capable de synthétiser une molécule signal produite au cours de la croissance cellulaire et 2) un gène codant une protéine réceptrice, un régulateur transcriptionnel activé par la molécule signal. Sous sa forme active, ce régulateur module l'expression des gènes régulés par le QS (Miller and Bassler, 2001). A faible densité cellulaire, le signal produit par les bactéries diffuse vers le milieu extracellulaire jusqu'à qu'il atteigne à forte densité cellulaire une concentration seuil ou quorum qui lui permet d'être détecté et de se lier à son récepteur protéique. L'ensemble (signal-récepteur) se comporte comme un facteur de transcription qui va se fixer sur l'ADN pour réguler l'expression de certains gènes cibles et donc amener au développement de certains phénotypes (Figure 3). Ce phénomène signal-réponse permet aux bactéries de synchroniser leurs comportements (Waters and Bassler, 2005).



**Figure 3.** Mécanisme général du QS bactérien.

L'accumulation de la molécule signal à forte densité cellulaire induit une réponse synchronisée des gènes cibles de QS.

Dans le cas de l'auto-inducteur de type 1, un des gènes régulés par QS est le gène codant pour la synthase. En effet, la fixation de l'ensemble signal-récepteur sur le promoteur du gène codant pour la synthase active l'expression de ce gène ce qui conduit à une surexpression de la protéine synthase et donc une surproduction de molécules signal (boucle de rétroaction positive) ayant comme conséquence d'amplifier le phénomène de communication via le QS (d'où le nom d'auto-inducteur donné également à ce signal) (Fuqua and Greenberg, 2002; Williams *et al.*, 2007).

Un ou plusieurs systèmes QS peuvent être trouvés chez une bactérie. Dans le dernier cas les différentes voies de QS sont souvent interconnectées soit au niveau de la synthèse soit de la transduction des signaux (Bassler, 2002; Berger *et al.*, 2011). C'est le cas par exemple des nombreuses bactéries pathogènes telles que *P. aeruginosa* (Mukherjee *et al.*, 2017) *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004) et *V. cholerae* (Suckow *et al.*, 2011).

### 2.3. Les différents systèmes de QS

Selon la définition, un système QS implique une production et une détection d'une molécule signal appelée auto-inducteur. Plusieurs familles de molécules signal ont été identifiées dont certaines sont plus ou moins étudiées. Chaque système QS est caractérisé par une famille d'auto-inducteur.

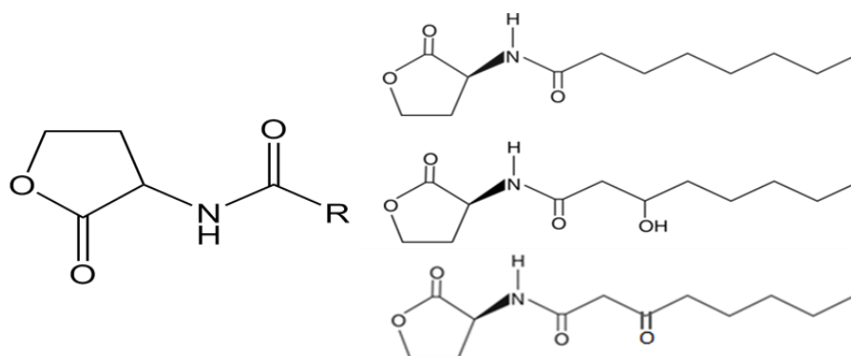
#### 2.3.1. Système d'acyle homosérine lactone (AHL) ou d'auto-inducteur 1 (AI1)

C'est le système qui semble à ce jour le plus utilisé par les bactéries Gram- notamment par les protéobactéries, le groupe bactérien le plus abondant dans les océans. C'est aussi le

premier découvert et l'un des mieux décrit. Plus de 70 espèces bactériennes différentes produisent une ou plusieurs AHLs (Gould *et al.*, 2006). Ce système domine donc la plupart des discussions sur le QS. Il met en jeu un couple de protéine synthase/récepteur qui appartient généralement à la famille LuxI/LuxR (homologue LuxI/LuxR) et une molécule d'AHL.

### 2.3.1.1. La molécule signal AHL

La majorité des AHLs identifiées à ce jour ont une structure caractéristique conservée formée d'un cycle d'homoserine lactone (HSL) substitué en position  $\alpha$  par une chaîne d'acyle (dérivée d'acide gras). Cette chaîne d'acyle est la partie qui permet de différencier les molécules d'AHLs. En fait, ces molécules ou auto-inducteurs peuvent être différencier par le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne d'acyle qui varie entre 4 et 18 atomes de carbone et aussi par l'état d'oxydation du carbone en position 3 qui peut être non substitué ou substitué par un groupement hydroxyle ou carbonyle (Figure 4) (Camilli and Bassler, 2006; Rajput *et al.*, 2016).



**Figure 4.** Structure d'une molécule d'AHL.

Structure générale d'une AHL (à gauche). Exemple de la N-octanoyl-L-homoserine lactone (C<sub>8</sub>-HSL) non substituée, substituée par un groupement hydroxyle ou carbonyle (à droite de haut vers le bas).

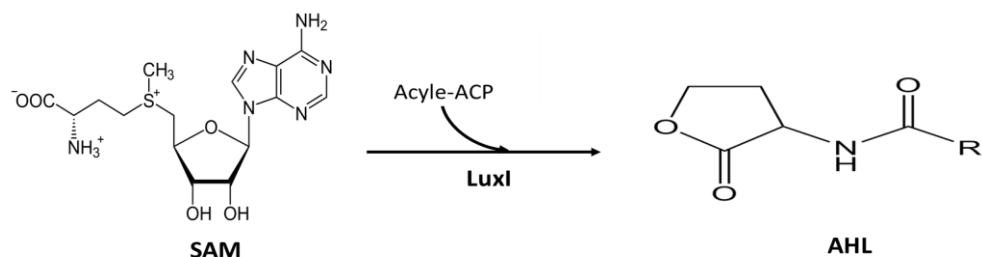
### 2.3.1.2. La synthèse d'AHL

Généralement, une molécule d'AHL est synthétisée par un enzyme appartenant à la famille des protéines de type LuxI en utilisant une protéine porteuse d'acyle (acyle-ACP) comme donneur principal de la chaîne d'acyle et un S-adénosyle méthionine (SAM) comme source du cycle d'homosérine lactone (Figure 5) (Bassler, 2002). Habituellement, une synthase produit une seule molécule d'AHL mais exception à la règle, certaines synthases produisent également des AHLs supplémentaires en faible concentration (Williams *et al.*, 2007). La base de données des génomes bactériens contient maintenant plus de 100 LuxI différents. Ces protéines sont généralement formées d'une séquence protéique comprise entre

190 et 230 acides aminés et partagent une identité d'environ 35%. En outre, la comparaison des séquences de différents LuxI comme LuxI de *V. fischeri*, LasI et RhII de *P. aeruginosa*, TofI de la bactérie pathogène des plantes *Bruscia glumae* suggère que le site de liaison du substrat SAM est situé dans le domaine N-terminal (Nt) contenant 7 résidus d'acides aminés conservés responsables de la fixation de ce substrat. Il s'agit des arginines 24, 71 et 104, du glutamate 46, de l'aspartate 51, de la glycine 68 (selon la numérotation de la protéine RhII) (Li and Nair, 2012). Par contre, le domaine C-terminal (Ct) contenant des résidus moins conservés chez les différents LuxI est proposé comme étant un site de liaison du substrat acyle-ACP qui est le donneur principal de la chaîne d'acyle dans la réaction de la synthèse d'AHL (Hanzelka et al., 1997; Parsek et al., 1997). Ceci explique la présence des plusieurs molécules d'AHLs différentes. Gould et al ont suggéré en 2006 une corrélation entre le résidu d'acide aminé trouvé en position 140 (selon la numérotation de la protéine EsaI, *Panroea stewartii*) et l'état d'oxydation du carbone en position 3 d'AHL synthétisée. La présence de thréonine à cette position est en corrélation avec la production de 3-oxo-HSLs, tandis que la présence d'alanine ou de glycine amène à une production d'AHLs non substituées, et qu'une sérine peut être corrélée avec la production de 3-hydroxy-HSLs (Gould et al., 2006). Cette spécificité a été validée avec la protéine homologue de LuxI, EsaI présente chez la bactérie pathogène des plantes *P. stewartii*. En fait, EsaI ayant une thréonine en position 140, produit naturellement la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL. En revanche, la substitution de ce résidu par une alanine a montré un changement spectaculaire de la production d'AHL à partir de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL chez le type sauvage en C<sub>6</sub>-HSL chez le mutant (Watson et al., 2002; Gould et al., 2006).

D'autre part, la biosynthèse d'AHL ne dépend pas exclusivement des protéines homologues de LuxI. La famille d'AHL synthase LuxM, découverte à l'origine chez *Vibrio harveyi* (Bassler et al., 1993) a été également trouvée chez d'autres espèces de *Vibrio* telles que *V. fischeri* (Hanzelka et al., 1999) et *V. anguillarum* (Milton et al., 2001). LuxM est donc une enzyme trouvée uniquement chez *Vibrio spp.* Elle ne présente aucune homologie au niveau de la séquence protéique avec LuxI, mais malgré cette différence, elle catalyse la synthèse d'AHL en utilisant les mêmes substrats que LuxI (acyle-ACP et SAM) (Atkinson et Williams, 2009). La protéine LuxM est beaucoup moins étudiée que LuxI. Elle est généralement formée d'une séquence protéique comprise entre 190 et 220 acides aminés. L'alignement protéique de cette protéine avec la base de données de NCBI a montré une identité comprise entre 76 et 90% avec d'autres protéines plus ou moins identifiées de bactéries appartenant au genre de *Vibrio*.





**Figure 5.** Schéma de la biosynthèse d'une AHL à partir du SAM par une protéine homologue de LuxI

### 2.3.1.3. Reception et mécanisme d'action d'AHL

Après leur synthèse, la majorité des AHLs peuvent traverser les membranes cellulaires par diffusion simple. Dans le cas d'AHLs à chaînes latérales longues, les AHLs sont transportées par transport actif (Pearson *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2007). C'est le cas des 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et C<sub>16</sub>-HSL synthétisées par *P. aeruginosa* et *Sinorhizobium meliloti* respectivement. Dans ces derniers cas, les AHLs sont exportées par un transport actif via des pompes à efflux spécifiques appartenant à la famille de résistance/nodulation/division cellulaire (RND) (Marketon *et al.*, 2003). Lorsqu'elles entrent dans les cellules par diffusion simple (AHLs à chaînes latérales courtes) ou par un transport actif (AHLs à chaînes latérales longues) et que leur concentration atteint un certain seuil critique, les AHLs se fixent sur le récepteur de la famille LuxR en induisant son activation et sa stabilisation (sans AHL, le récepteur LuxR est instable et se dégrade rapidement, alors que la fixation d'AHL le protège contre la protéolyse) (Galloway *et al.*, 2010).

Les membres de la famille LuxR sont des régulateurs transcriptionnels qui ont une structure d'homodimère composée de deux domaines. Le domaine N-terminal (Nt) qui est le site de liaison des AHLs, est constitué d'environ 170 résidus et le domaine C-terminal (Ct) contenant le site d'interaction avec l'ADN est constitué d'environ 65 résidus. Après sa liaison à l'ADN sur une séquence palindromique spécifique appelée *lux box*, le complexe LuxR-AHL induit une modification de l'expression génétique et module donc la transcription de certains gènes cibles (dont le gène de la synthase *luxI*) suite à l'accumulation d'AHL. Selon la littérature (Bassler, 2002; Waters and Bassler, 2005), LuxR montre une certaine spécificité pour un type donné d'AHL basée sur la longueur, la saturation et l'oxydation de la chaîne d'acyle d'AHL. En fait, la liaison entre le domaine Nt de LuxR et la molécule d'AHL se fait à travers des interactions électrostatiques tels que le pont hydrogène entre des résidus d'acides aminés conservés chez la plupart des LuxR et le cycle d'homoserine lactone d'AHL d'une part et à travers des interactions de Van der Waals entre des résidus d'acides aminés moins conservés et la chaîne latérale d'acyle caractéristique d'une AHL d'autre part (Williams *et al.*,

2007; Li and Nair, 2012). Selon Chai et Winans, trois acides aminés conservés chez les homologues LuxR sont responsables de la liaison avec le cycle d'homosérine lactone à travers de pont d'hydrogène, il s'agit de tryptophane 57, thyrosine 53 et aspartate 70 (selon la numérotation de TraR) qui se lient respectivement avec le groupement carbonyle d'homosérine lactone, le groupement carbonyle et le groupement NH de la liaison amide (Chai and Winans, 2004). Dans la même étude, Chai et Winans ont montré l'importance du résidu thréonine 129 (numérotation TraR). Ils ont suggéré que cet acide aminé est responsable de la liaison avec le groupement carbonyle de la chaîne latérale substituée d'une AHL dont le résidu est remplacé par une sérine chez les LuxR qui détectent des AHLs non substituées (Chai and Winans, 2004).

Pareillement au domaine Nt, des acides aminés permettant la liaison de LuxR sur l'ADN sont trouvés conservés dans le domaine Ct chez les différents homologues LuxR. Citons par exemple selon la numérotation de TraR, le glutamate 178, la leucine 182, la glycine 188 et la thréonine 190 (Li and Nair, 2012). Selon la présence ou l'absence de ces résidus, les homologues LuxR sont classés respectivement en protéine fonctionnelle pouvant se lier à l'ADN et réguler des gènes cibles, ou en simple orthologue LuxR non fonctionnel qui ne peut pas se lier à l'ADN (Subramoni *et al.*, 2015).

Finalement, comme dans le cas de la synthèse d'AHL, une protéine LuxN, récepteur d'AHL qui ne partage aucune homologie avec LuxR, a été identifiée chez *Vibrio* spp (Henke and Bassler, 2004). LuxN est un récepteur membranaire histidine kinase formé d'environ 300 résidus d'acides aminés avec un domaine Nt périplasmidique contenant le site de liaison à l'AHL et un domaine Ct cytoplasmique contenant le site d'activité kinase (Swem *et al.*, 2008). Lors de la liaison avec l'AHL, LuxN fonctionne comme une phosphorylase et la transduction de signal se traduit par une cascade de déphosphorylations amenant à l'activation d'un facteur transcriptionnel qui régule à son tour l'expression de certains gènes cibles (Henke and Bassler, 2004; Papenfort and Bassler, 2016).

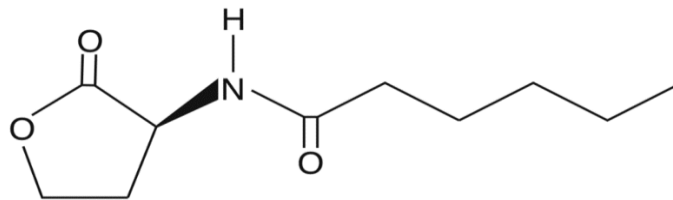
#### **2.3.1.4. Exemples de système AHL de QS**

Un grand nombre de bactéries Gram- communiquent avec des signaux AHLs (LaSarre and Federle, 2013). Dans les paragraphes ci-après, deux exemples présentant le cas de *V. fischeri* et *P. aeruginosae* sont détaillés.

2.3.1.4.1 Cas de *V. fischeri* :

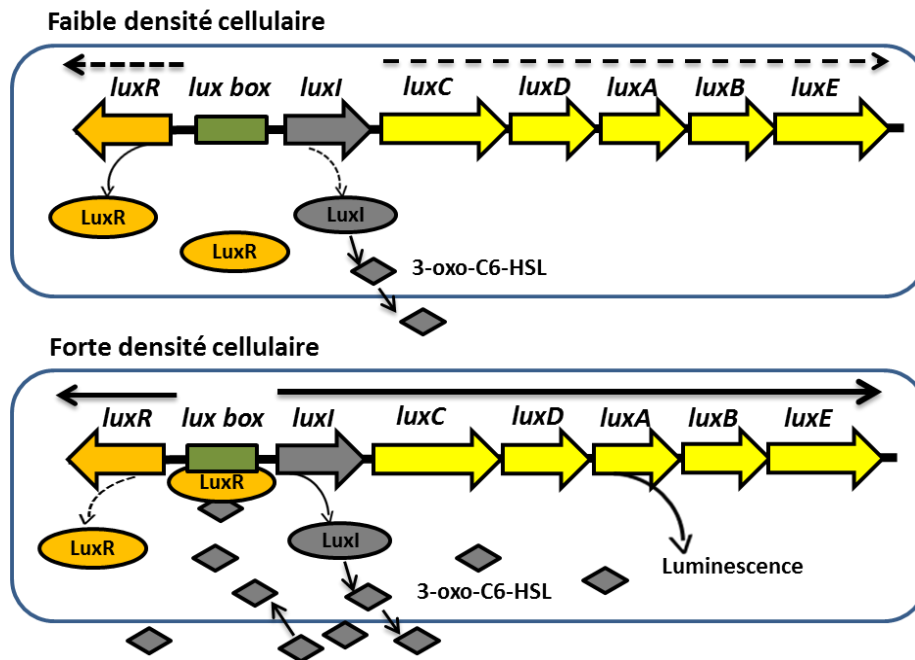
Le premier système de communication utilisant des AHLs a été découvert en 1970 par Nealson *et al* (Nealson *et al.*, 1970) chez la bactérie marine *V. fischeri*. Ce système basé sur l'émission de la bioluminescence d'une manière densité cellulaire dépendante est considéré comme le paradigme du QS chez la plupart des bactéries Gram- (Nealson and Hastings, 1979).

Chez *V. fischeri*, l'auto-inducteur est la 3-oxo-hexanoyl-*L*-homosérine lactone (3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL) (Figure 6) (Eberhard *et al.*, 1981), qui est synthétisé par LuxI et diffuse passivement à travers la membrane cellulaire des bactéries jusqu'à qu'il atteigne à forte densité cellulaire une concertation seuil qui lui permette d'être détecté par son récepteur, le régulateur transcriptionnel, LuxR.



**Figure 6.** Structure de la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL.

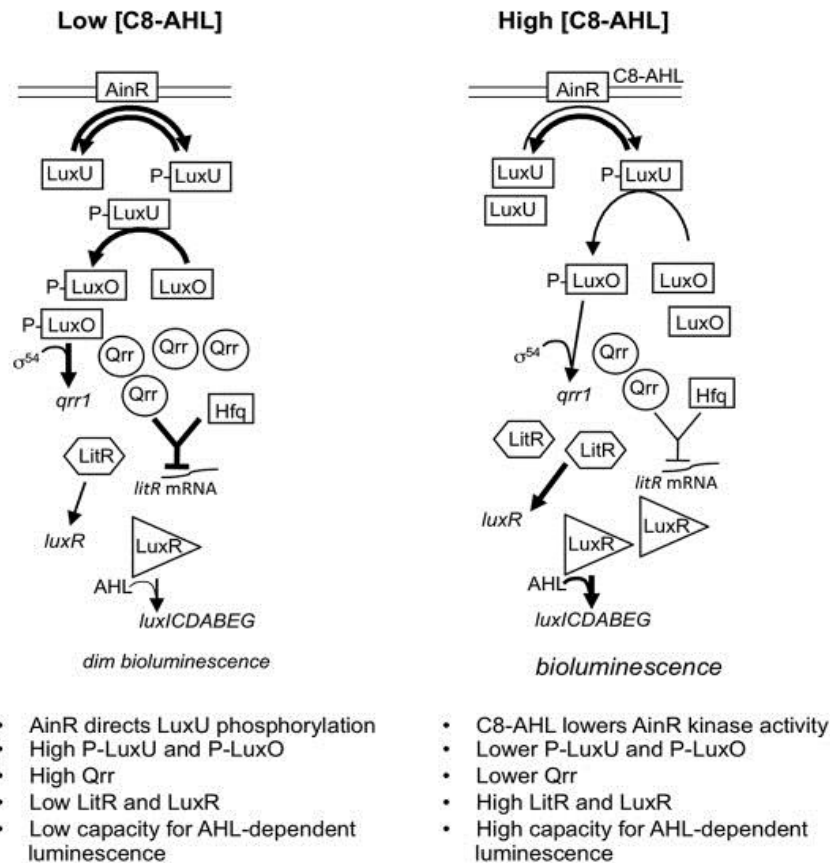
LuxR est un polypeptide de 250 acides aminés constitué de deux domaines. Le domaine Nt contenant le site de liaison de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL et le domaine Ct contenant le site de liaison à l'ADN (Egland and Greenberg, 1999). En absence de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL, le domaine Nt bloque l'activité du domaine Ct, ce qui empêche la liaison de LuxR à l'ADN. La liaison de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL au domaine Nt induit un changement de conformation de LuxR. Le domaine Ct devient actif, ce qui permet au complexe 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL-LuxR d'activer la transcription du gène *luxI* et des gènes qui codent pour la bioluminescence (*luxICDABE*) en se fixant sur 20 paires de bases inversement répétées du promoteur appelé *lux-box* (Kaplan et Greenberg, 1985) (Figure 7). D'autres gènes sous le contrôle du complexe 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL-LuxR ont été identifiés par Antunes *et al* (Antunes *et al.*, 2007). Ces gènes semblent être nécessaires à la vie en symbiose de cette bactérie avec *Euprymna scolopes*. En effet, la souche *V. fischeri* ES114 mutée au niveau de *luxR* a montré une colonisation réduite d'*Euprymna scolopes in vitro* (Visick *et al.*, 2000). Selon Antunes *et al* le complexe 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL-LuxR pourrait activer des gènes codant des protéases et des peptidases impliquées dans l'acquisition des nutriments pour *V. fischeri* pendant la vie en symbiose. Ce complexe pourrait activer également un gène codant une adhésine facilitant la colonisation des organes du calmar *E. scolops* (Antunes *et al.*, 2007).



**Figure 7.** Mécanisme de QS chez *V. fischeri*.

Le complexe AHL-LuxR active par sa liaison au promoteur connu sous le nom de *lux box* la transcription des gènes *luxR* (récepteur AHL), *luxI* (synthase AHL) et l'opéron *lux* (*luxCDABE*, bioluminescence).

A noter qu'il existe chez *V. fischeri* un deuxième auto-inducteur appartenant à la famille d'AHL, il s'agit de C<sub>8</sub>-HSL synthétisée par AinS, une protéine homologue au LuxM. C<sub>8</sub>-HSL est détectée par AinR, un récepteur membranaire histidine kinase homologue au LuxN (Kimbrough and Stabb, 2013). La transduction du signal C<sub>8</sub>-HSL par LuxN se fait à travers quatre protéines. Une protéine cytoplasmique LuxU, une protéine régulatrice LuxO, une protéine chaperonne Hfq et un régulateur de réponse LitR (Kimbrough and Stabb, 2017). À faible concentration de C<sub>8</sub>-HSL, LuxN fonctionne comme une kinase et phosphoryle alors LuxU. Ce dernier transfère le phosphate à la protéine régulatrice LuxO. La protéine LuxO phosphorylée, une fois en interaction avec le facteur de transcription sigma-54, active la transcription de gènes qui codent pour des ARNs (Qrr). Ces ARNs, avec la protéine chaperonne Hfq, déstabilisent l'ARNm qui code la protéine LitR, activateur de la transcription du LuxR, récepteur de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL (Figure 8). Cependant, à forte concentration de C<sub>8</sub>-HSL, LuxN fonctionne comme une phosphatase. Dans ce cas, LuxO est inactif, ce qui permet la transcription de la protéine LuxR. LuxR en liaison avec le 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL permet l'expression de l'opéron *lux* (*luxICDABE*), ce qui se traduit par l'expression de la bioluminescence chez *V. fischeri* (Figure 8) (Kimbrough and Stabb, 2013).



**Figure 8.** Modèle de la transduction du signal C<sub>8</sub>-HSL par LuxN chez *V. fischeri*.

À faible concentration de C<sub>8</sub>-HSL, LuxN fonctionne comme une kinase ce qui amène à une inhibition de la synthèse de LuxR. À forte concentration de C<sub>8</sub>-HSL, LuxN agit comme une phosphatase, ce qui se traduit par l'expression de LuxR. LuxR en liaison avec l'AHN permet l'expression de la bioluminescence chez *V. fischeri*. Les flèches plus épaisses indiquent les voies actives dans les deux cas (Kimbrough and Stabb, 2013).

Bien que le système Ain soit moins étudié que le système Lux chez *V. fischeri*, il a été démontré que C<sub>8</sub>-HSL est capable de se lier au récepteur LuxR et active alors la bioluminescence mais avec un niveau moins élevé que la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL (Lupp *et al.*, 2003; Lupp and Ruby, 2004). Le signal C<sub>8</sub>-HSL agit sur la bioluminescence à travers LuxR soit par l'activation de son expression soit par en le protégeant de la protéolyse (comme c'est noté plus haut, sans AHL, le récepteur LuxR est instable et se dégrade rapidement, alors que la fixation d'AHN le protège contre la protéolyse) (Lupp and Ruby, 2004). Lupp *et al* ont montré que l'expression de deux systèmes Ain et Lux est nécessaire à l'induction maximale de l'opéron *lux*, et donc de la bioluminescence de *V. fischeri* (Lupp *et al.*, 2003).

En plus de la bioluminescence, d'autres processus régulés par le système Ain ont été identifiés chez *V. fischeri* comme la mobilité et le métabolisme cellulaire (Lupp and Ruby, 2005). Lupp et Ruby ont déterminé en 2005 que l'expression de 30 gènes différents chez *V. fischeri*, sous le contrôle du système Ain impliquant la transcription de plusieurs gènes codant pour des flagellines (*flaA*, *flaB*, *flac*) et des protéines basales du corps flagellaire (*flgB*, *flgC*,

*flgD*), peut être inhibée par ce système (Lupp and Ruby, 2005). De plus, une mutation au niveau du système Ain réduit la colonisation d'*E. scolops* par *V. fischeri* (Lupp et al., 2003). Ceci peut être expliqué par le fait que l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire et dans l'adaptation à des conditions environnementales spécifiques est activée par le signal C<sub>8</sub>-HSL, tel que VFA0452 et VFA0806 codant respectivement des enzymes impliquées dans le métabolisme d'histidine et dans la synthèse de polysaccharides (Lupp and Ruby, 2005; Studer et al., 2008).

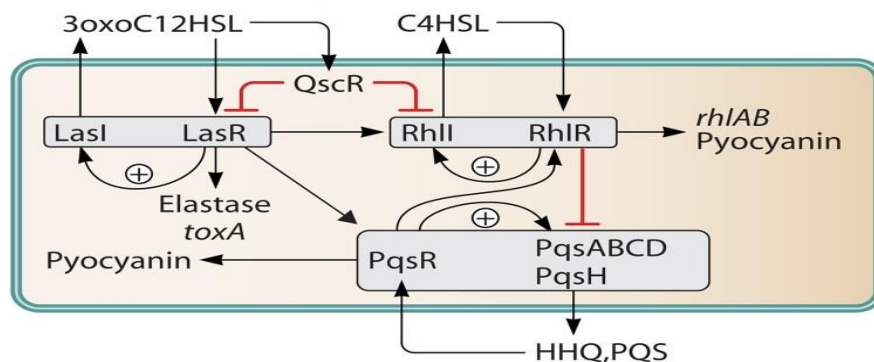
#### 2.3.1.4.2 Cas de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une bactérie Gram- qui est retrouvée à la fois dans l'eau et dans le sol. C'est une bactérie pathogène opportuniste de l'Homme, des animaux et des plantes. Elle possède des systèmes QS qui sont bien caractérisés et bien étudiés, ce qui lui confère un rôle de modèle parmi les bactéries ayant plusieurs systèmes QS ou plusieurs molécules signal.

Le QS chez cette bactérie joue un rôle très important dans la régulation des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, la formation du biofilm et la synthèse des facteurs de virulence comme les exoprotéases, les lipases et les sidérophores (Parsek and Greenberg, 2000). L'inhibition du QS chez *P. aeruginosa* induit alors une diminution de sa pathogénicité (Rajesh and Ravishankar Rai, 2014; Rajesh and Rai, 2016).

Le QS chez *P. aeruginosa* est un réseau de régulation complexe composé de trois types des signaux/récepteurs distincts qui fonctionnent d'une manière hiérarchique (Figure 9). *P. aeruginosa* a deux paires d'homologues LuxI/LuxR. Il s'agit de LasI/LasR et de RhII/RhIR, qui produisent et détectent respectivement la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et la C<sub>4</sub>-HSL. Le complexe LasR-3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL induit l'expression d'un certain nombre de gènes de virulence (Pearson et al., 1994) dont le gène *lasB* codant l'élastase qui cause des dommages tissulaires pendant l'infection ainsi que les gènes *lasI*, *rhlI* et *rhlR* codant respectivement la synthèse de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (LasI), la synthase (RhlI) et le récepteur (RhlR) de la C<sub>4</sub>-HSL. Ces différents gènes cibles seraient activés par différentes concentrations de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (Seed et al., 1995). Le complexe RhlR-C<sub>4</sub>-HSL intervient sur sa propre auto-induction mais n'a aucun effet direct sur le système Las. En fait, il est impliqué dans l'activation de l'expression d'une autre classe de gènes de virulence tels que les rhamnolipides et la pyocyanine (Pearson et al., 1997). En outre, LasR et RhlR, régulent respectivement d'une manière positive et négative l'expression de gènes impliqués dans le troisième système QS qui est peu étudié par rapport aux deux autres et qui repose sur l'auto-inducteur appartenant à la famille des Quinolones : 2-heptyl-

3-hydroxy-4-quinolone (*Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal : PQS). Après sa liaison avec son récepteur PqsR qui est aussi un facteur transcriptionnel, le signal PQS permet l'activation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la virulence dont ceux des opérons *pqsABCD* et *pqsH* codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse de PQS (rétrocontrôle positif) ainsi que le gène *rhIR* formant cette fois une boucle de rétroaction négative (Lee and Zhang, 2015) et le gène *lecA* impliqué dans la synthèse de lectine qui induit des lésions pulmonaires aiguës (Dubern and Diggle, 2008). De plus, il existe chez *P. aeruginosa* une protéine de type luxR-solo (expliqué dans la paragraphe ci-dessous), QscR qui peut se lier à la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et inhibe ensuite les systèmes d'AHLs par de multiples mécanismes (Dubern and Diggle, 2008) (Nadal Jimenez et al., 2012).



**Figure 9.** Les différents systèmes de QS chez *Pseudomonas aeruginosa* (LaSarre and Federle, 2013).

*P. aeruginosa* possède trois systèmes QS : Las, Rhl et PQS. Dans le système Las, un récepteur LasR est activé par l'AHL 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, synthétisée par LasI et le complexe active les systèmes Las, PQS et Rhl. PQS se lie à son récepteur PqsR, et le complexe régule les systèmes PQS et Rhl. Le système Rhl se compose de RhlR et de son signal C<sub>4</sub>-HSL, synthétisé par RhlI. Le complexe C<sub>4</sub>-HSL/RhlR s'auto-régule positivement et régule négativement le système PQS. Ces 3 systèmes de QS contrôlent la production d'une gamme de facteurs de virulence et l'expression de comportements variés.

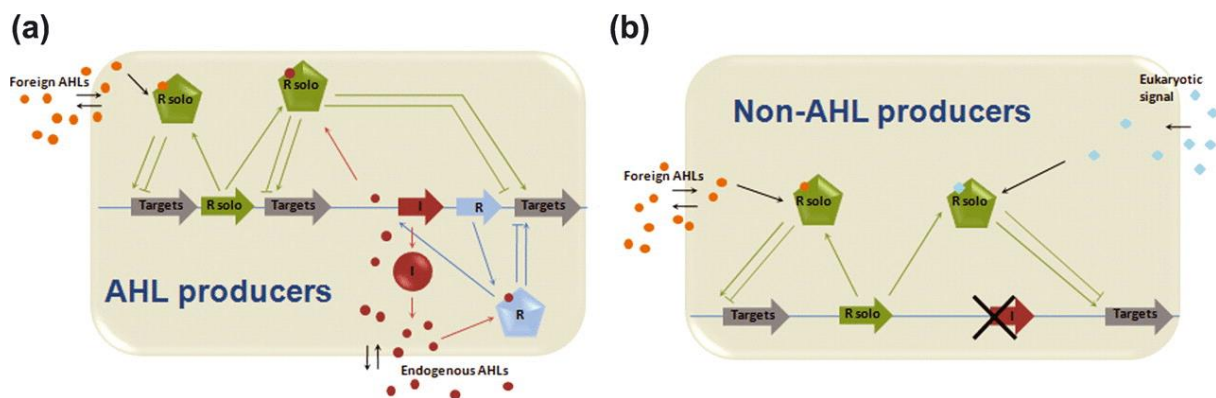
### 2.3.1.5. Famille de protéine Lux-solo

Généralement, les gènes *luxI/luxR* sont trouvés côte-à-côte dans le génome et régulés par le même opéron comme c'est le cas chez *V. fischeri* et *P. aeruginosa* décrits ci-dessus (Scholz and Greenberg, 2017). Parfois, les gènes *luxR* ou *luxI* sont retrouvés dans les génomes de certaines bactéries sans pour autant être associés à leurs partenaires respectifs *luxI* ou *luxR*, ils sont alors classés comme lux-solo. La fonction et les implications écologiques de ces solos commencent tout juste à faire l'objet d'investigations plus approfondies et pourraient avoir une importance particulière pour les bactéries Gram- (Hmelo, 2017).

#### 2.3.1.5.1 Famille LuxR-solo

Selon les études, le gène *luxR-solo* est répandu chez les bactéries qui possèdent un système AHL complet actif ainsi que chez celles qui ne synthétisent pas d'AHLs (Figure 10)

(Subramoni and Venturi, 2009; Patankar and González, 2009). Les LuxR-solo peuvent avoir une séquence plus ou moins longues que LuxR mais ils possèdent toujours un domaine Nt contenant le site de liaison d'auto-inducteur et un domaine Ct contenant le site de liaison à l'ADN (Fuqua, 2006). Ces protéines ont un rôle régulateur important dans divers processus bactériens tels que la virulence, la nodulation, la motilité et la régulation de QS (Patankar and González, 2009). D'après Subramoni *et al.*, sur 3540 génomes bactériens séquencés, il existe 6030 protéines LuxR dont 1170 sont des LuxR associés à une synthase LuxI et 4860 sont des LuxR-solo (Subramoni *et al.*, 2015). Selon le domaine Nt et le type d'acides aminés conservés chez les différentes protéines LuxR, les LuxR-solo peuvent être classés en 2 groupes. Les membres du premier groupe ont une séquence protéique contenant des résidus tryptophane 57, thyrosine 53 et aspartate 70 selon la numérotation de TraR et peuvent se lier à des molécules d'AHLs comme par exemple QscR chez *P. aeruginosa*, ExpR chez *Sinorhizobium meliloti* (Pellock *et al.*, 2002) et BisR chez *Rhizobium leguminosarum* (Wilkinson *et al.*, 2002). Le 2<sup>ème</sup> groupe regroupe les LuxR-solo qui ont des résidus d'acides aminés différents de ceux responsables de la liaison avec les AHLs et peuvent se lier à des molécules autres que les AHLs (non AHLs) comme par exemple le cas d'OryR chez *Xanthomonas oryzae* (Feruaga *et al.*, 2007), de XccR chez *Xanthomonas campestris* (Zhang *et al.*, 2007) et de PsoR chez *P. fluorescens* (Subramoni *et al.*, 2011) qui peuvent se lier à des molécules dérivées de plantes (Xu *et al.*, 2015). En revanche, selon la présence ou l'absence des acides aminés conservés dans la domaine Ct des différentes protéines LuxR comme la glutamate 178, la leucine 182, la glycine 188 et la thréonine 190 (selon la numérotation de TraR), les LuxR-solo peuvent être classés respectivement en protéine fonctionnelle pouvant se lier à l'ADN et réguler des gènes cibles, ou en simple orthologue LuxR non fonctionnel qui ne peut pas se lier à l'ADN (Li and Nair, 2012; Subramoni *et al.*, 2015).



**Figure 10.** Rôles possibles de LuxR-solo dans le cas de la présence ou l'absence de la production d'AHLs (Subramoni and Venturi, 2009).

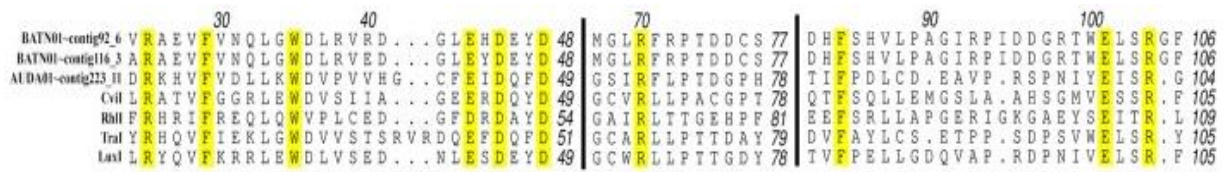


Dans le cas de bactéries productrices d’AHLs (A), le LuxR-solo peut détecter des AHLs endogènes ou exogènes. Dans le cas de bactéries non productrices d’AHLs (B), le LuxR-solo peut détecter des AHLs exogènes ou d’autres signaux provenant également d’eucaryotes. Les LuxR-solos peuvent alors contrôler différents ensembles d’expression génique cible.

Deux cas de figure ont été décrits : Dans le cas où le LuxR-solo est présent chez les bactéries qui possèdent un système AHL actif, il peut détecter des AHLs endogènes ainsi que des AHLs exogènes synthétisées par d’autres bactéries mettant en jeu une spécificité différente de celle d’un LuxR classique vis-à-vis des AHLs. Dans le cas où les bactéries ne synthétisent pas d’AHLs, le LuxR-solo permet aux bactéries qui en possèdent, de réguler selon leur entourage l’expression de certains gènes suite à la réponse aux AHLs produites par d’autres bactéries voisines (Subramoni and Venturi, 2009) ou aux autres signaux pouvant être synthétisés par des organismes eucaryotes comme les plantes. La première étude concernant un LuxR-solo en milieu marin a été récemment publiée (Gardiner *et al.*, 2015). Dans cette étude Gardiner *et al* ont trouvé que la protéine VarR appartenant à la famille de LuxR-solo est nécessaire à la formation du biofilm par la macroalgue pathogène *Nautella italica* R11. Le tableau 1 montre le rôle de quelques protéines LuxR-solo les plus caractérisées telles que le QscR de *P. aeruginosa* qui peut réguler l’expression de certains gènes, autres que ceux contrôlés par les systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR suite à sa liaison avec la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL synthétisée par LasI (Lequette *et al.*, 2006).

#### 2.3.1.5.2 Famille LuxI-solo

En comparaison avec les LuxR-solo, les LuxI-solo sont rarement signalés et moins bien compris. Zan *et al* ont publié en 2012 (Zan *et al.*, 2012) la première caractérisation fonctionnelle d’une protéine SscI appartenant à la famille de LuxI-solo chez *Ruegeria* sp. KLH11 qui vit en symbiose avec une éponge marine. Ils ont déterminé que SscI est impliqué avec une paire d’homologues LuxI/LuxR (SsaI/SsaR) dans la régulation de la mobilité de *Ruegeria* sp. KLH11. En revanche, le gène *luxI*-solo est souvent présent chez les bactéries appartenant au genre des *Roseobacter* qui représentent 25% des bactéries marines côtières suggérant un rôle important de ce gène dans la dynamique des communautés microbiennes marines (Cude and Buchan, 2013). Récemment, deux gènes putatifs *luxI*-solo ont été identifiés respectivement chez les bactéries terrestres *Sphingobium* sp. KK2 et *Sphingobium chinhatense* IP26 (Gan *et al.*, 2015). L’alignement protéiques des produits de ces gènes avec des LuxI connus tels que CviI de *C. violaceum*, LasI, RhII de *P. aeruginosa* et TraI d’*A. tumefaciens* a montré la présence de tous les résidus d’acides aminés conservés chez les différents LuxI et nécessaires pour la synthèse d’AHL (Figure 11) (Gan *et al.*, 2015).



**Figure 11.** Alignement des protéines putatives LuxI-solo chez *Sphingobium* sp. KK2 et *Sphingobium chinhatense* IP26.

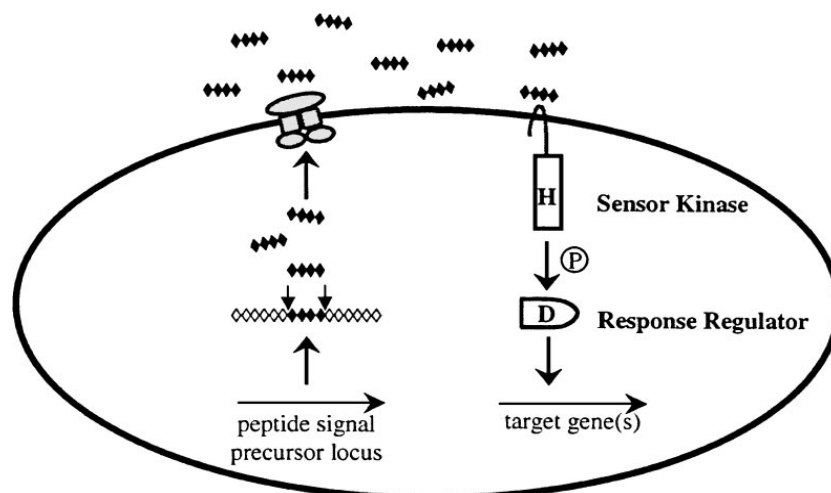
Les résidus colorés en jaune sont ceux conservés chez toutes les protéines de type LuxI (Gan *et al.*, 2015).

**Tableau 1.** Fonctions de LuxR-solo chez quelques bactéries (Subramoni and Venturi, 2009).

| LuxR-solo   | Organisme                                | Système AHL      | Molécules cibles                                                                                                                           | Fonctions régulés                                                                  | Références                             |
|-------------|------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>QscR</b> | <i>P. aeruginosa</i>                     | LasI/R<br>RhlI/R | 3-oxo- C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> -<br>HSL                                                                                          | Production d’AHLs et des facteurs de virulences                                    | (Lequette <i>et al.</i> , 2006)        |
| <b>ExpR</b> | <i>Sinorhizobium meliloti</i>            | SinI/R<br>Mel    | C <sub>14</sub> , C <sub>18</sub> -HSL<br>3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL<br>C <sub>16</sub> :1-HSL<br>3-oxo-C <sub>16</sub> -HSL               | Production d’EPSII, Mobilité,<br>Fixation de l’azote, transport des métaux, etc... | (McIntosh <i>et al.</i> , 2008)        |
| <b>SdiA</b> | <i>E. coli</i><br><i>Salmonella spp.</i> | Pas de luxI/R    | C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> -HSL<br>3-oxo-C <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> ,<br>C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> -HSL | Production des facteurs de virulence,<br>Adhésion                                  | (Ahmer, 2004; Xu <i>et al.</i> , 2006) |
| <b>OryR</b> | <i>Xanthomonas oryzae</i>                | Pas de LuxI/R    | Acide salicylique<br>Acide abscissique<br>(ABA)                                                                                            | Production d’EPS et des facteurs de virulence                                      | (Xu <i>et al.</i> , 2015)              |

### 2.3.2. Système de peptides

La signalisation QS via des oligopeptides est un système généralement décrit chez les bactéries Gram+ qui régulent une variété de processus en réponse à l'augmentation de la densité cellulaire. Malgré la grande similarité au niveau du mécanisme général avec le système AHL basé sur les protéines LuxM et LuxN, des différences ont été décrites. Par exemple, les peptides ne sont pas capables de diffuser à travers la membrane cellulaire d'où la nécessité d'un transport actif via des transporteurs spécialisés situés dans la membrane cellulaire tels que les transporteurs ABC (Miller and Bassler, 2001; Sturme *et al.*, 2002). Ces peptides sont ensuite détectés lorsque leur concentration atteint un certain seuil par un récepteur membranaire histidine kinase. En général, suite à la liaison du peptide sur le domaine de detection du senseur, un changement de conformation se traduit dans ce dernier, ce qui induit une activation de son domaine kinase aboutissant à la phosphorylation d'un régulateur de réponse, un facteur transcriptionnel qui sous sa forme phosphorylée, peut se lier à l'ADN et régule l'expression de certains gènes cibles (Figure 12) (Miller and Bassler, 2001).

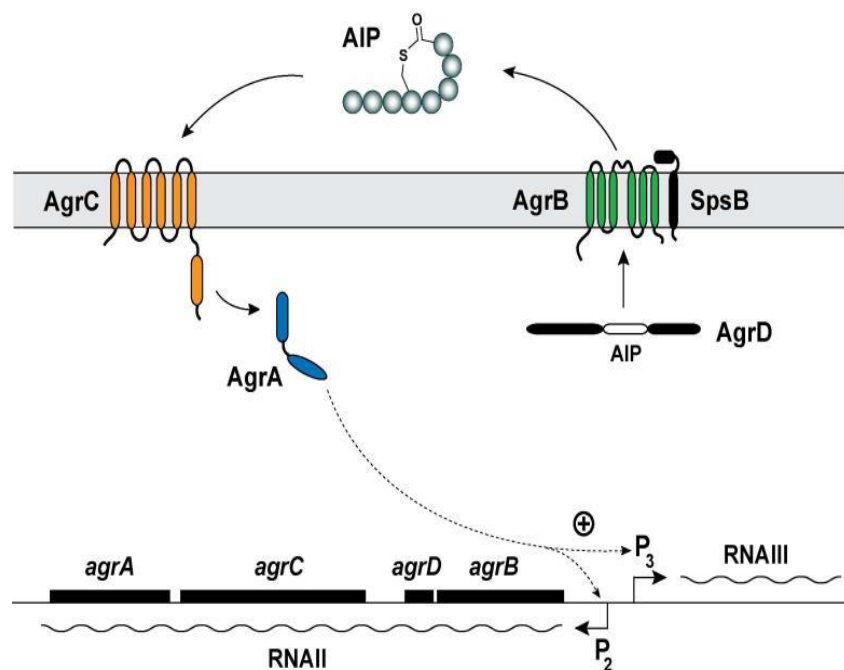


**Figure 12.** Modèle générale de système de communication QS via des peptides chez les bactéries Gram+ (Miller and Bassler, 2001).

Chez les bactéries Gram+, la molécule peptidique signal (diamants noirs) est obtenue par clivage d'une protéine précurseur (diamants noirs et blancs). Le signal est transporté ensuite hors de la cellule via un transporteur ABC (complexe protéique gris). Au bout d'un certain seuil, le signal peptidique est détecté par son récepteur, un système à deux composants et la transcription des gènes cibles est régulée suite à l'activation d'un facteur transcriptionnel par phosphorylation.

Les systèmes de peptide les plus caractérisés sont le système Agr de *Staphylococcus aureus* et le système Fsr d'*Enterococcus faecalis* qui contrôlent tous les deux la production des facteurs de virulence (LaSarre and Federle, 2013).

Dans le cas de *S. aureus*, l'auto-inducteur peptidique (AIP) est synthétisé par un clivage de la protéine précurseur nommé AgrD sous l'action des protéines membranaires AgrB et SpsB qui transportent ensuite le signal au milieu extracellulaire (Figure 13) (Thoendel *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2013). Au bout d'une certaine concentration, AIP se lie avec son récepteur membranaire histidine kinase AgrC qui en réponse phosphoryle un régulateur transcriptionnel nommé AgrA. Sous son état phosphorylé, AgrA active l'expression de deux régions spécifiques dans l'ADN appelées RNAII et RNAIII en se fixant sur leur promoteur nommé P2 et P3 (Figure 13) (Thoendel *et al.*, 2011). RNAII contient l'opéron *agr* (*agrBDCA*) codant les protéines impliquées dans la synthèse, le transport et la réception d'AIP, ce qui se traduit par une boucle de rétrocontrôle positive. RNAIII contient des gènes codant pour des ARNs qui stimulent la synthèse des facteurs de virulence comme les toxines, les protéases et les lipases en stabilisant leurs ARN messager (ARNm) (Thoendel *et al.*, 2011; Seidl *et al.*, 2011).



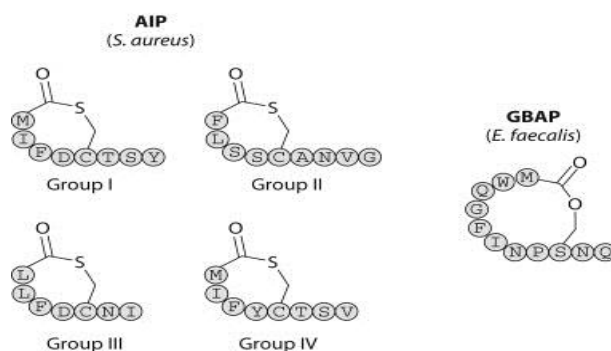
**Figure 13.** Schéma du système Agr chez *S. aureus*.

Chez *S. aureus*, le signal AIP est synthétisé et transporté par AgrB et SpsB à partir du précurseur AgrD. Suite à la liaison d'AIP sur son récepteur membranaire histidine kinase AgrC, le régulateur de réponse AgrA est phosphorylé et régule ensuite l'expression de deux régions d'ADN nommées RNAII et RNAIII (Thoendel *et al.*, 2011).

À cause des différences flagrantes trouvées au niveau des séquences codantes pour AgrB, AgrC et AgrD, quatre groupes du système Agr ont été identifiés à partir des différentes souches de *S. aureus* (Agr-I, Agr-II, Agr-III, et Agr-IV) (Jarraud *et al.*, 2000). Chaque souche de *S. aureus* possède un système Agr basé sur un type d'AIP appartenant donc

à quatre groupes distincts (AIP-I à AIP-IV) (Figure 14) (Ji *et al.*, 1997; Jarraud *et al.*, 2000; Geisinger *et al.*, 2012). Normalement, chaque AIP se fixe sur son récepteur appartenant au même groupe, mais du fait de la similarité de la structure moléculaire des différents AIP, le récepteur AgrC appartenant à un groupe donné peut se lier aux 4 molécules d'AIP, si elles sont présentes dans le milieu mais avec une affinité différente, ce qui amène à une inhibition de la réponse régulée par QS (Thoendel *et al.*, 2011; Jabbari *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2018).

En outre, un seul système Fsr a été identifié chez *E. faecalis*. Il est basé sur un peptide nommé GBAP (Figure 14) (gelatinase biosynthesis activating pheromone) qui agit comme auto-inducteur. Cet auto-inducteur est détecté par un récepteur kinase nommé FsrC. Une fois activé, FsrC régule, grâce à son activité kinase, la production de gélatinase, qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides favorisant ainsi la virulence d'*E. faecalis* (Nakayama *et al.*, 2001).



**Figure 14.** Structures des peptides cycliques utilisés par *S. aureus* et *E. faecalis* (LaSarre and Federle, 2013). La séquence d'acides aminés de chacun des quatre AIP identifiés chez *S. aureus* et de GBAP identifié chez *E. faecalis* est représentée.

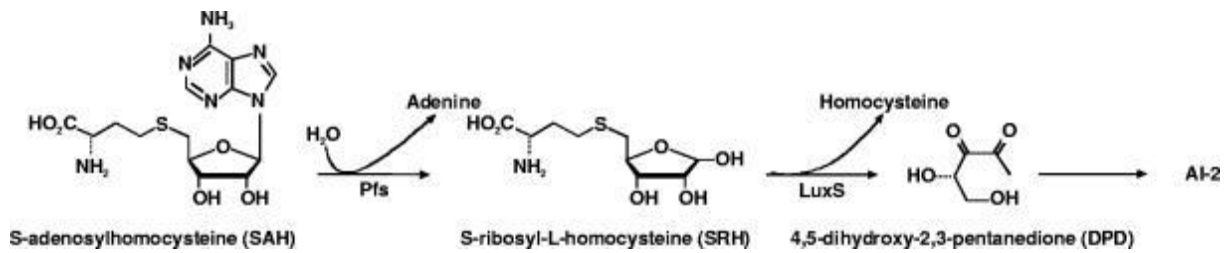
### 2.3.3. Système d'Auto-inducteur 2 (AI2)

Les AHLs et les peptides sont les deux principales molécules de signalisation QS utilisées respectivement par les bactéries Gram- et Gram+ dans la communication intra-espèce (intraspécifique). En outre, une troisième molécule appelée auto-inducteur 2 (AI2) a été identifiée comme une molécule de signalisation interspécifique utilisée à la fois par les bactéries Gram- et Gram+ (Xavier and Bassler, 2003).

#### 2.3.3.1. Mécanisme d'action du système AI2

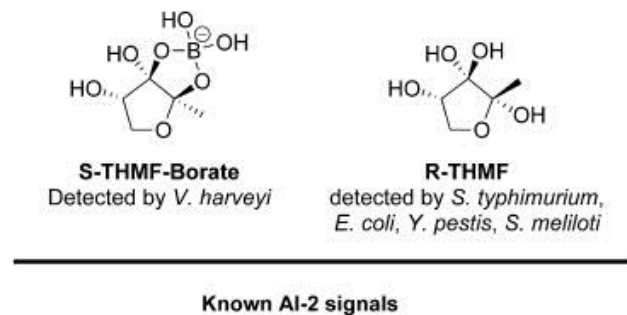
Le système AI2 a été décrit pour la première fois chez la bactérie marine *V. harveyi* en 1994, le décrivant comme un système régulateur de l'émission de la bioluminescence chez cette bactérie (Bassler *et al.*, 1994). L'AI2, un furanosyl-borate diester, est synthétisé par le produit du gène *luxS* largement conservé chez les bactéries Gram- et Gram+. LuxS (S-ribosyl-

homocysteine lyase) catalyse le clivage de l'homocystéine à partir de la S-ribosyl-L-homocystéine (SRH) générée à partir de la S-adénosylhomocystéine (SAH) sous l'action d'une enzyme nommée Pfs ou MTAN (5'-methyl-thioadenosine/S-adenosyl-homocysteine nucleosidase) pour donner le précurseur d'AI2 : le 4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) qui est instable et réalise alors une réaction de cyclisation spontanée en donnant l'AI2 (Figure 15) (Challan Belval *et al.*, 2006).



**Figure 15.** Schéma de la biosynthèse d'AI2 à partir de la SAH sous l'action de Pfs et LuxS (Challan Belval *et al.*, 2006).

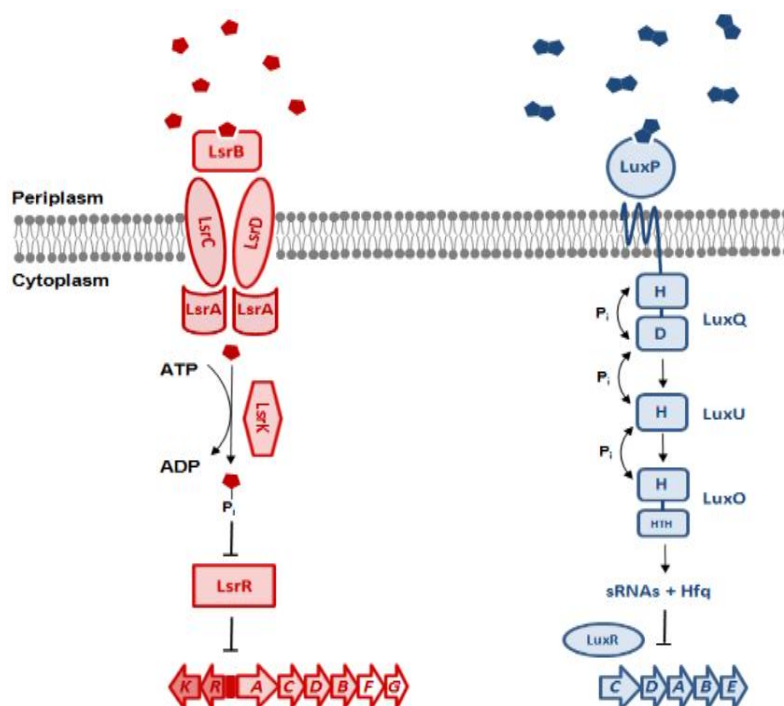
Comme dans le cas des AHLs, l'AI2 diffuse librement à travers la membrane cellulaire après sa synthèse jusqu'à ce qu'il atteigne à forte densité cellulaire une concentration seuil qui lui permette d'être détecté par son récepteur membranaire (Henke and Bassler, 2004). A ce jour, deux formes d'AI2 ont été identifiées : celle détectée par *V. harveyi* (*Vibrionaceae*) (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate (S-THMF-borate) et celle détectée par *Salmonella typhimurium* (*Enterobacteriaceae*) (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (R-THMF) (Tavender *et al.*, 2008) (Figure 16).



**Figure 16.** Structure des molécules d'AI2 identifiées chez les *Vibrionaceae* (à gauche) et les *Enterobacteriaceae* (à droite) (Lowery *et al.*, 2013).

Chez les *Vibrionaceae*, la transduction du signal AI2 implique une protéine périplasmique LuxP, responsable de la détection d'AI2 et un phosphorelay complexe. Suite à la liaison avec l'AI2, le senseur LuxQ fonctionne comme une phosphatase et déphosphoryle une protéine nommée LuxU, qui déphosphoryle à son tour une autre nommée LuxO. Cette dernière module la transcription des gènes cibles (Figure 17) (Henke and Bassler, 2004). Chez les *Enterobacteriaceae*, l'AI2 est détecté par un transporteur ABC nommé Lsr qui

l'internalise dans le cytoplasme bactérien. L'AI2 est ensuite phosphorylé sous l'action d'une kinase nommée LsrK, ce qui lui permet de se lier à un régulateur transcriptionnel nommé LsrR qui module à son tour l'expression des gènes cibles (Taga *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004).



**Figure 17.** Transduction du signal AI-2 chez les *Enterobacteriaceae* (à gauche, en rouge) et les *Vibrionaceae* (à droite, en bleu) (Rezzonico *et al.*, 2012).

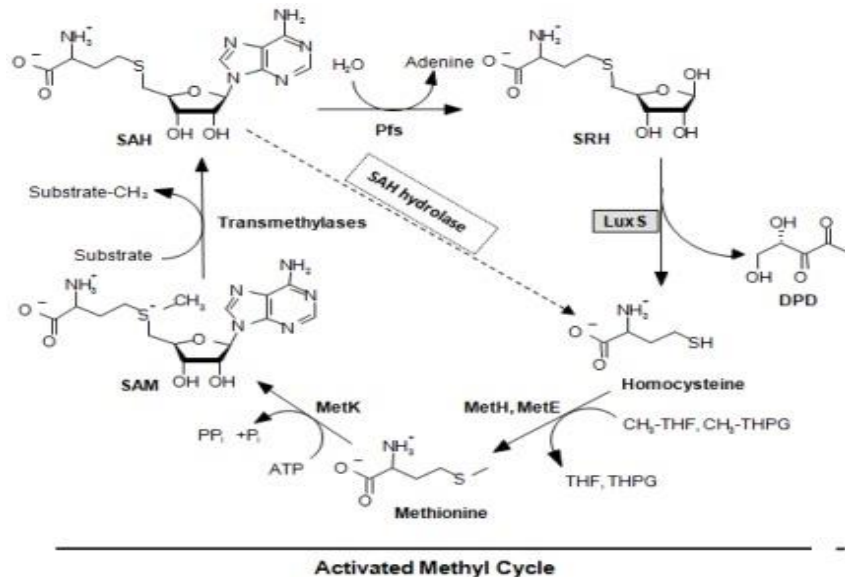
Dans le cas d'*Enterobacteriaceae*, l'AI2 est détecté par un transporteur ABC nommé Lsr qui la phosphoryle, ce qui lui permet de se lier à un régulateur transcriptionnel nommé LsrR qui module à son tour les gènes cibles. Dans le cas de *Vibrionaceae*, l'AI2 est détecté par le récepteur LuxP et, suite à une chaîne de déphosphorylation débutant par l'activité de LuxQ, une régulation de la transcription des gènes cibles est effectuée indirectement par LuxO.

### 2.3.3.2. Rôle de LuxS dans le métabolisme bactérien

LuxS est une métallo enzyme impliquée dans la synthèse d'AI2 et l'absence de cette enzyme implique directement une absence de la synthèse de la molécule signal AI2. Cette molécule est considérée comme une molécule de signalisation interspécifique à cause de la conservation du gène *luxS* chez un grand nombre des bactéries Gram- et Gram+. Plusieurs auteurs ont rapporté l'effet du système LuxS/AI2 sur de nombreux phénotypes bactériens y compris la virulence, la formation du biofilm (notamment le biofilm mixte), la motilité, la production de toxines et d'antibiotiques, la luminescence et l'expression des transporteurs ABC (Federle and Bassler, 2003; Parashar *et al.*, 2015). Citons par exemple le cas de *Streptococcus suis* pour lequel la mutation de *luxS* inhibe la formation du biofilm et l'addition d'AI2 exogène restaure le phénotype normal (Wang *et al.*, 2011). En outre, certaines bactéries possèdent le gène *luxS* sans par autant posséder les gènes codant pour les récepteurs LuxPQ



ou Lsr. C'est le cas de *Shewanella oneidensis* MR-1. La mutation de *luxS* chez cette bactérie (qui ne possède pas un récepteur d'AI2) inhibe la formation du biofilm après 16h de croissance mais l'addition d'AI2 exogène ne restaure pas le phénotype normal suggérant un autre rôle de LuxS au niveau de métabolisme bactérien notamment dans le cycle méthylique (AMC : activated methyl cycle) (Figure 18) (Learman *et al.*, 2009).



**Figure 18.** Les deux voies d'hydrolyse de la substance toxique SAH soit par SAH hydrolase soit par Pfs et LuxS via l'AMC (Activated methyl cycle) en produisant l'AI2 (Rezzonico *et al.*, 2012).

Tous les organismes vivants effectuent une variété de réactions de transfert de méthyle, dans lesquelles la S-adenosylméthionine (SAM) est utilisée comme donneur de méthyle. Le sous-produit de ces réactions est la S-adenosylhomocystéine (SAH). En raison de sa similarité structurale avec la SAM, la SAH est un inhibiteur puissant de plusieurs enzymes SAM-dépendants et est donc un métabolite hautement toxique (Pei and Zhu, 2004). Chez les eucaryotes, les archées et les bactéries qui ne possèdent pas de LuxS, la SAH est convertie en adénosine et homocystéine en une seule étape catalysée par la SAH hydrolase (SAHH) (Figure 16). En revanche, les bactéries ayant le LuxS ont développé un mécanisme plus élaboré, se décomposant en deux étapes impliquant la nucléosidase Pfs et LuxS pour accomplir la même tâche (Xavier and Bassler, 2003). Ce chemin de détoxification est connu aussi comme une voie de la synthèse d'AI2 élaboré lors de l'action de LuxS sur SRH (Figure 16). Selon Xavier et Bassler (Xavier and Bassler, 2003), il n'existe pas d'exemple de bactéries qui possèdent à la fois une SAHH et un LuxS. Une mutation au niveau de *luxS* inhibe donc à la fois la synthèse d'AI2 et la régénération de SAM (précurseur de synthèse d'AHLs) et de la méthionine via l'AMC. C'est la raison pour laquelle une inhibition de LuxS

chez une bactérie qui n'a pas un récepteur d'AI2 pourrait modifier l'expression phénotypique chez cette bactérie par modification du métabolisme cellulaire.

### 2.3.4. Autres systèmes

Les trois molécules signal ou systèmes cités ci-dessus sont les systèmes les plus décrits mais il existe d'autres signaux qui ont été identifiés à ce jour comme appartenant au QS. Le tableau 2 regroupe ces molécules signal avec les microorganismes dont elles sont issues et les phénotypes qui sont sous le contrôle de ces systèmes.

#### 2.3.4.1. AHLs non traditionnelles

Comme il a été décrit au-dessus, une molécule d'AHL est synthétisée à partir de deux substrats, SAM et acyle-ACP par l'action d'une protéine LuxI homologue. Récemment, de nouveaux homologues LuxI ont été déterminés. Ces LuxI synthétisent des molécules d'AHLs non traditionnelles (Figure 19) en utilisant la SAM et l'acyle-CoA à la place d'acyle-ACP (Lindemann *et al.*, 2011). La régulation de l'expression génétique par ces AHLs est plus ou moins caractérisée chez les différentes bactéries qui les synthétisent. Par exemple, l'isovaleryl-HSL est synthétisée par une protéine homologue à LuxI, BjaI chez la bactérie symbiotique des plantes *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Cette molécule signal possède une protéine homologue à LuxR, BjaR<sub>1</sub> comme récepteur. Les gènes régulés par le complexe isovaleryl-HSL/BjaR<sub>1</sub> sont inconnus à ce jour (Lindemann *et al.*, 2011). En revanche, la *p*-Coumaroyl-HSL synthétisée par RpaI (un homologue de LuxI) chez la bactérie photosynthétique *Rhodospseudomonas palustris*, s'associe au récepteur RpaR (homologue LuxR). Le complexe *p*-Coumaroyl-HSL/RpaR est alors capable d'induire l'expression de 17 gènes différents, incluant le gène *rpaI* (Schaefer *et al.*, 2008).

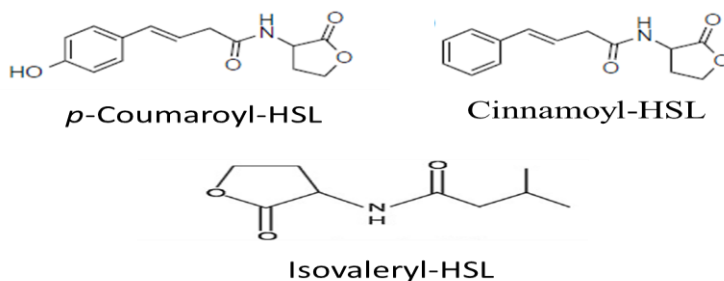


Figure 19. Structures moléculaires des AHLs non traditionnelles.

#### 2.3.4.1. Cholera auto-inducteur 1 (CAI-1)

Le CAI-1 est une molécule signal de  $\alpha$ -hydroxyketones (Figure 20). Elle est trouvée principalement chez plusieurs espèces bactériennes appartenant au genre de *Vibrio* tels que *V.*

*harveyi* et *V. cholerae*, chez lesquelles elle participe à la régulation de la virulence et de la formation du biofilm (Kelly *et al.*, 2009). Le CAI-1 est synthétisé par la protéine synthase CqsA en utilisant le (S)-2-aminobutyrate et le décanoyle-CoA comme substrats pour générer l' amino-CAI-1 qui est converti en CAI-1 par une réaction indépendante de CqsA. Cette molécule signal est détectée par un récepteur kinase CqsS qui en réponse déclenche une cascade de déphosphorylations amenant à une modulation de l'expression des gènes cibles (Henke and Bassler, 2004).

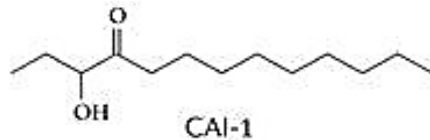


Figure 20. Structure moléculaire de CAI-1 chez *V. cholerae*.

#### 2.3.4.2. Pseudomonas quinolone signal (PQS)

Comme indiqué plus haut, le PQS est la 3<sup>ème</sup> molécule signal trouvée chez la bactérie *Pseudomonas*. Il s'agit d'une molécule de 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (Figure 21) synthétisée par une enzyme codée par un opéron nommé *pqsABCDE* en utilisant le 2-heptyle-4(1H)-hydroxyquinoline (HHQ) comme substrat (Pesci *et al.*, 1999; Dubern and Diggle, 2008). Ce signal moléculaire est détecté par la protéine PqsR. En plus de la boucle de rétrocontrôle positive créée par le complexe PQS/PqsR en activant la transcription des opérons *pqsABCDE* et *pqsH* nécessaires pour la synthèse de PQS (Lee and Zhang, 2015), ce complexe active aussi la transcription de nombreux gènes impliqués dans la virulence tel que *lecA* nécessaire à la synthèse de lectines qui induit des lésions pulmonaires aiguës (Dubern and Diggle, 2008).

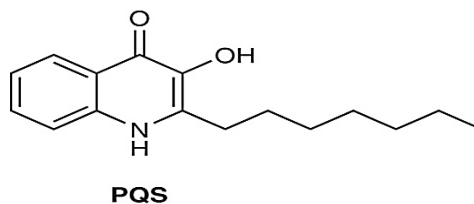


Figure 21. Structure moléculaire de PQS.

#### 2.3.4.3. Palmitic acid methyl ester (PAME)

Le 3-hydroxy palmitic acid methyl ester (3-OH-PAME) (Figure 22) est une molécule signal identifiée chez la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum*. Le gène *phcB* code l'enzyme responsable de la synthèse de 3-OH-PAME. PhcB utilise un acide 3-hydroxy-palmitique et un méthyle-ester comme substrats. Ce signal est détecté par un système à deux composant PhcS-PhcR (Waters and Bassler, 2005) qui en réponse à 3-OH-PAME, active d'une manière

indirecte l'expression de *SolI*, une AHL synthase, ce qui induit indirectement l'expression de facteurs de virulence (Flavier *et al.*, 1997).

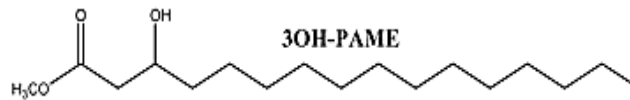


Figure 22. Structure moléculaire de 3-OH-PAME.

#### 2.3.4.4. Diffusible signal factor (DSF)

Le DSF est une molécule signal d'acide cis-11-méthyl-2-dodécénoïque (Figure 23) identifié chez la bactérie pathogène des plantes, *Xanthomonas campestris* qui régule la production d'enzymes extracellulaires comme les protéases, les pectinases et les cellulases impliquées dans la régulation de la formation du biofilm en utilisant un système de communication QS médié par la molécule DSF. Les gènes *rpf* sont les gènes responsables de la synthèse (*rpfF*), la détection (*rpfC*) et la transduction (*rpfG*) du signal DSF (Atkinson et Williams, 2009 ; (Deng *et al.*, 2014).

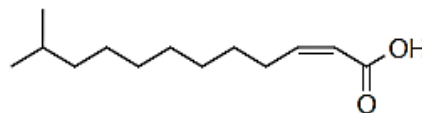


Figure 23. Structure moléculaire de DSF.

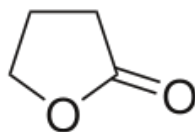
#### 2.3.4.5. Dipeptide cyclique (CDP) ou diketopiperazine (DKP)

Le dipeptide cyclique est une molécule signal de QS découverte chez les bactéries Gram-. Elle est particulièrement synthétisée par les bactéries marines telles que *Vibrio* spp. Elle est générée par l'action de la cyclopeptide oxydase sur 2 molécules de SAM (Bellezza *et al.*, 2014). Les CDPs peuvent se lier au LuxR induisant alors l'expression des gènes AHLs dépendant. Par exemple, le cyclo (Phe-Pro) synthétisé par *V. vulnificus* est capable d'induire la luminescence de *V. fischeri* (Park *et al.*, 2006). Récemment, ce type de molécule signal a été détecté chez des bactéries responsables de la détérioration d'aliments telles que *Shewanella baltica* (Zhu *et al.*, 2016).

#### 2.3.4.6. Gamma butyrolactone (GBL)

Les GBLs (Figure 24) sont des signaux moléculaires identifiés chez des bactéries Gram+ telles que *Streptomyces* spp. (Slattery *et al.*, 2001). Ce système a été bien caractérisé par Gottelt *et al* chez *S. coelicolor* en 2012. La molécule signal GBL est synthétisée par une synthase nommée ScbA et le gène *scbR* code pour son récepteur. Le complexe GBL/ScbR

permet une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'antibiotiques et dans l'autorégulation de la synthèse de GBL (Gottelt *et al.*, 2012).



**Figure 24.** Structure moléculaire du Gamma butyrolactone.

#### **2.3.4.7. Pyrones**

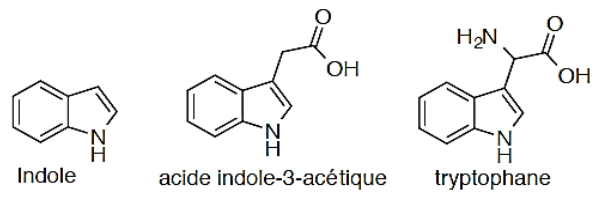
L' $\alpha$ -pyrone est une molécule signal isolée chez une bactérie pathogène d'insectes, *Photorhabdus luminescens*. La protéine PpyS est responsable de la synthèse d' $\alpha$ -pyrone qui est détecté par une protéine LuxR-solo nommée PluR. PluR détecte les  $\alpha$ -pyrones endogènes avec une sensibilité élevée (nanomolaire). En présence de cette molécule signal, PluR stimule l'expression des gènes impliqués dans la bioluminescence de *P. luminescens* ainsi que du gène *ppyS*, induisant une boucle de rétrocontrôle positive sur la synthèse des  $\alpha$ -pyrones (Brameyer and Heermann, 2015).

#### **2.3.4.8. Auto-inducteur 3 (AI3)**

L'AI3 est la molécule signal impliquée dans la virulence chez la famille des *Enterobacteriaceae* telle que la bactérie Entero-hémorragique *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. Walters et Sperandio ont rapporté en 2006 l'implication de LuxS dans la synthèse d'AI3. En effet, une mutation au niveau de *luxS* induit une diminution de la virulence d'*E. coli* O157:H7. Ce signal AI3 est transduit via un système à deux composants QseC et QseB qui, en réponse, permet l'activation de l'expression des gènes de virulence chez *E. coli* O157:H7 (Walters and Sperandio, 2006). Ce signal est peu étudié, ni la voie de biosynthèse, ni la structure d'AI3 ne sont connues à ce jour (Weigel and Demuth, 2016).

#### **2.3.4.9. Indole**

Les plantes tout comme certaines bactéries et certains champignons produisent de l'acide indole-3-acétique (IAA) (Figure 25). L'IAA est l'hormone végétale la plus courante de la classe des auxines. Elle régule divers aspects de la croissance et du développement des plantes (Fu *et al.*, 2015). Chez les microorganismes, l'indole permet la régulation de l'expression génétique. L'indole est synthétisé à partir du tryptophane et il a été rapporté chez plusieurs bactéries Gram- et Gram+ comme un régulateur de la virulence et de la formation du biofilm (Lee and Lee, 2010).



**Figure 25.** Structures moléculaires de l'indole, l'acide indole-3-acétique et tryptophane.

**Tableau 2.** Les autres systèmes ou signaux QS trouvés dans l'environnement marin et terrestre.

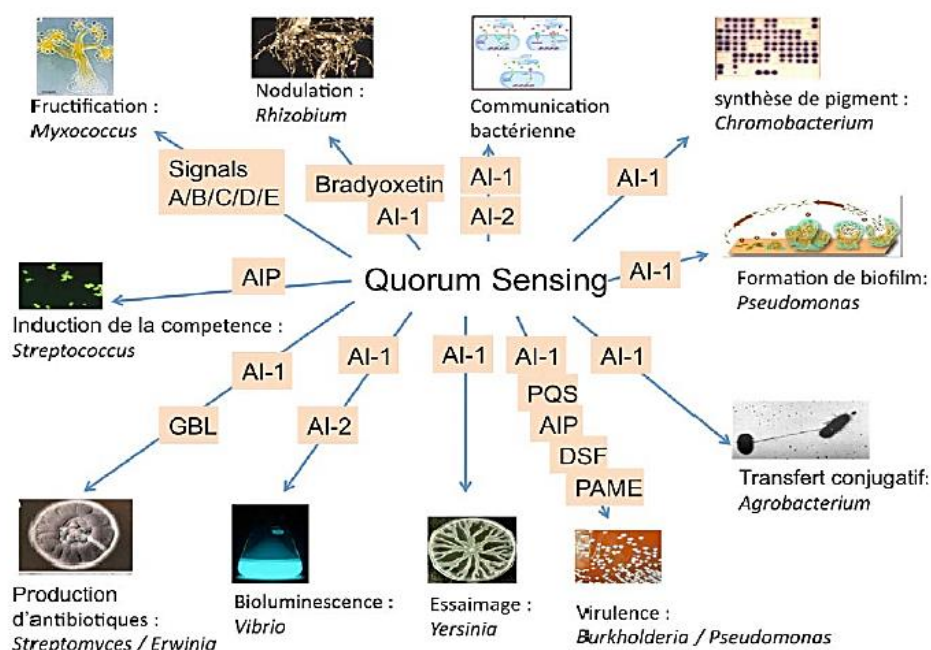
| Signal ou système QS               | Structure                        | Microorganismes représentatifs                                   | Phénotype(s) Régulé(s)            | références                         |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| AHLs non traditionnelles           | <i>p</i> -Coumaroyl-HSL          | <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009                         | Expression génétique globale      | (Schaefer <i>et al.</i> , 2008)    |
|                                    | Cinnamoyl-HSL                    | <i>Bradyrhizobium spp.</i>                                       | Non identifié                     | (Ahlgren <i>et al.</i> , 2011)     |
|                                    | Isovaleryl-HSL                   | <i>B. japonicum</i> USDA110                                      | Non identifié                     | (Lindemann <i>et al.</i> , 2011)   |
|                                    | N-carboxyl-acyl-HSL              | <i>Archaeum Methanotherix harundinacea</i>                       | Croissance filamenteuse           | (Zhang <i>et al.</i> , 2012)       |
| Cholera auto-inducteur 1 (CAI-1)   | $\alpha$ -Hydroxyketones         | <i>Vibrio spp.</i> et <i>Legionella pneumophila</i>              | Virulence et formation du biofilm | (Kelly <i>et al.</i> , 2009)       |
| Pseudomonas quinolone signal (PQS) | Quinolone                        | <i>P. aeruginosa</i>                                             | Virulence et formation du biofilm | (Pesci <i>et al.</i> , 1999)       |
| Palmitic acid methyl ester (PAME)  | 3-OH-PAME                        | <i>Ralstonia solanacearum</i>                                    | Virulence                         | (Flavier <i>et al.</i> , 1997)     |
| Diffusible signal factor (DSF)     | Acide cis-11-méthyl-2-dodecenoic | <i>Xanthomonas campestris</i> et <i>burkholderia cenocepacia</i> | Virulence et formation du biofilm | (Atkinson and Williams, 2009; Deng |

|                              |                    |                                                      |                                       |                                     |
|------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
|                              |                    |                                                      |                                       | <i>et al.</i> , 2014)               |
| Dipeptide cyclique (CDP)     | Dipeptide cyclique | <i>Vibrio spp.</i>                                   | Expression des gènes<br>AHL dépendant | (Bellezza <i>et al.</i> , 2014)     |
| Gamma butyrolactone<br>(GBL) | butyrolactone      | <i>Streptomyces spp.</i>                             | Production<br>d'antibiotiques         | (Slattery <i>et al.</i> , 2001)     |
| Pyrones                      | $\alpha$ -Pyrones  | <i>Photobacterium luminescens</i>                    | Luminescence                          | (Brachmann <i>et al.</i> ,<br>2013) |
| Auto-inducteur 3<br>(AI3)    | Inconnu            | Enterohemorragique<br><i>Escherichia coli</i> (EHEC) | Virulence                             | (Walters and<br>Sperandio, 2006)    |
| Indole                       | 2,3-Benzopyrrole   | Plusieurs bactéries Gram- et<br>Gram+                | Virulence et formation<br>du biofilm  | (Lee and Lee, 2010)                 |



## 2.4. Phénotypes régulés par QS chez les bactéries

Sachant que le QS permet la régulation et la synchronisation de l'expression génétique au sein d'une communauté bactérienne, plusieurs phénotypes ou processus bactériens ont été rapportés à ce jour comme étant sous la régulation d'un ou plusieurs systèmes QS (Figure 26). Le cas de la bioluminescence ainsi que la formation du biofilm sont détaillés ci-après.

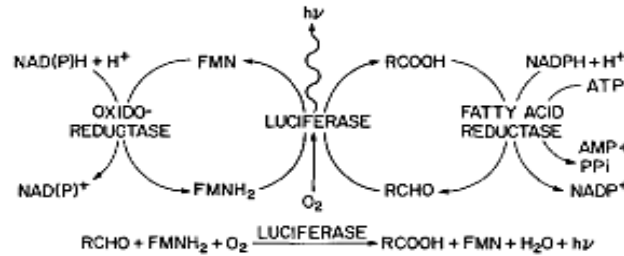


**Figure 26.** Exemples des processus bactériens régulés par QS chez les bactéries. Plusieurs processus bactériens ont été rapporté comme étant sous le contrôle de QS. Cette photo prise de la thèse de Margot Doberva représente certains d'entre eux avec la bactérie représentative de chaque processus (Doberva, 2016).

### 2.4.1. La bioluminescence

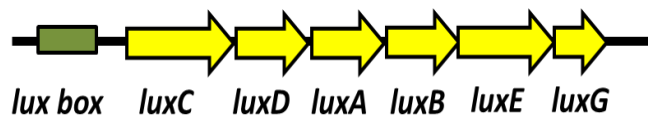
Le phénomène de la bioluminescence est à l'origine de la découverte, la caractérisation et la compréhension du QS, dont le premier système QS caractérisé a été identifié chez la bactérie luminescente marine *V. fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). Ce phénomène est défini comme une réaction chimique dans laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse aboutissant alors à l'émission de la lumière par des organismes vivants (Peat and Adams, 2008). L'enzyme intervenant dans cette réaction est la luciférase, une protéine formée de deux sous unités différentes, alpha ( $\alpha$ ) contenant le site de liaison de substrat et beta ( $\beta$ ) permettant la régulation de la réponse. La luciférase est une oxydase à multiples fonctions puisqu'elle catalyse en même temps l'oxydation de l'aldéhyde et de la flavine mononucléotide réduite (FMNH<sub>2</sub>) (Figure 27) (Nealson and Hastings, 1979; Bassler *et al.*, 1993; Peat and Adams, 2008). Ceci entraîne une conversion de la luciférine en

oxyluciférine excitée énergétiquement et instable qui émet pendant son retour à l'état stable un photon aboutissant à la production de la lumière. De plus, la FMN et l'acide gras produits lors de cette réaction sont ensuite réduits en FMNH<sub>2</sub> et aldéhyde par l'action de la FMN réductase et d'une acide gras réductase, respectivement (Peat and Adams, 2008).



**Figure 27.** Schéma représentant la réaction de la luminescence catalysée par la luciférase. La luciférase catalyse l'oxydation de FMNH<sub>2</sub> et d'aldéhyde en présence d'oxygène. Ceci aboutit à la production de lumière, de FMN et d'acide gras. La FMN et l'acide gras produits lors de cette réaction sont ensuite réduits en FMNH<sub>2</sub> et aldéhyde par l'action d'oxydo-réductase (FMN réductase) et d'acide gras réductase respectivement (Peat and Adams, 2008).

Chez les bactéries luminescentes, les gènes codant pour la luciférase ainsi que les enzymes impliqués dans la synthèse de ses substrats (FMNH<sub>2</sub> et aldéhyde) sont organisés en opéron nommé *lux* dont l'expression est contrôlée par un promoteur nommé *lux box* (Kaplan et Greenberg, 1985) (Figure 28). L'opéron *lux* est composé généralement de 6 gènes, *luxCDABEG*. Les gènes *luxA* et *luxB* sont les gènes codant respectivement pour les deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase, tandis que les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent pour les enzymes impliqués dans la synthèse d'aldéhyde. Enfin, *luxG* code pour une protéine impliquée dans la synthèse de la flavine réduite (FMN reductase) (Bassler *et al.*, 1997; Peat and Adams, 2008).

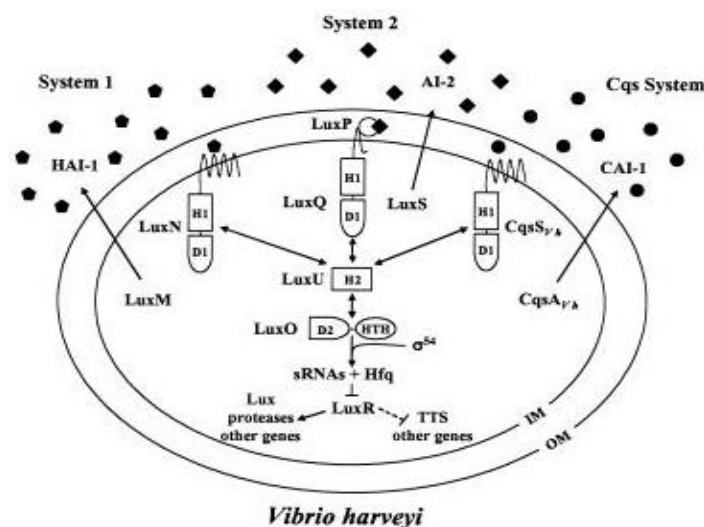


**Figure 28.** Organisation de l'opéron *lux* chez les bactéries luminescentes. L'opéron *lux* est composé généralement de 6 gènes, *luxCDABEG* qui codent pour la luciférase et les enzymes impliqués dans la synthèse d'aldéhyde et de FMNH<sub>2</sub>. L'expression de cet opéron est contrôlée par son promoteur nommé *lux box*.

Bien que les bactéries luminescentes sont abondantes dans l'environnement et surtout dans le milieu marin (Reichelt and Baumann, 1973), seules quelques espèces ont été décrites pour leurs mécanismes cellulaires de luminescence comme *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), *V. fischeri* (Egland and Greenberg, 1999) et *V. campbellii* (Liu Zhu *et al.*, 2012). Malgré les différences constatées entre les différents mécanismes identifiés, un facteur commun a été retrouvé généralement, c'est la présence d'un ou plusieurs systèmes QS contrôlant la luminescence chez ces bactéries.

Dans le cas de *V. fischeri*, la luminescence est contrôlée par deux systèmes de QS, le système Lux (LuxI/LuxR) et le système Ain (homologues LuxM/LuxN) dont la fixation du régulateur transcriptionnel LuxR sur le promoteur *lux box* active l'expression de l'opéron *lux* aboutissant alors à l'émission de la bioluminescence (Page 42). L'inactivation de l'un de ces deux systèmes diminuent alors la bioluminescence de *V. fischeri* (Visick *et al.*, 2000; Lupp *et al.*, 2003).

Dans le cas de *V. harveyi*, trois systèmes contrôlant la luminescence ont été identifiés incluant trois molécules signal (Figure 29) (Henke and Bassler, 2004). Il s'agit de 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL, AI<sub>2</sub> et CAI-1. CqsS/CqsA. Ces auto-inducteurs sont synthétisés respectivement par LuxN, LuxS et CqsA. La transduction de ces signaux à travers leurs récepteurs, LuxM, LuxPQ, et CqsS se fait similairement à celle décrite pour le système Ain de *V. fischeri* (Page 44). En résumé, le signal est transduit par la déphosphorylation de la protéine LuxO, ce qui amène à la stabilisation de la traduction du régulateur transcriptionnel LuxR (il ne s'agit pas d'un récepteur AHL mais il est un homologue du LitR qui est identifié chez *V. fischeri*), qui va se fixer sur *lux box* et active alors l'expression de l'opéron *lux* et donc la luminescence de *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004).



**Figure 29.** Les trois systèmes de QS présentent chez *V. harveyi*. Chez *V. harveyi*, trois molécules signal ont été identifiées. La transduction de ces signaux passe par une voie commune impliquant LuxU, LuxO, Hfq et LuxR (Henke and Bassler, 2004).

À noter qu'à ce jour, aucune bactérie luminescente dont le QS n'influe pas sa luminescence n'a été identifiée. Même chez les bactéries qui ne possèdent pas un système QS actif comme *Photobacterium luminescens*, des protéines LuxR-solo ont été retrouvées. Ces LuxR-solo comme PauR et PluR peuvent induire la luminescence de *P. luminescens* en

réponse à des molécules endogènes (non AHL) telles que le pyrone et le diacylresorcinol (Brameyer and Heermann, 2015).

#### 2.4.2. La formation du biofilm

La formation ou le développement du biofilm est un processus multifactoriel complexe qui est contrôlé par une combinaison de conditions environnementales et de fonctions cellulaires génétiquement contrôlés (Kjelleberg and Molin, 2002). Dans ce cadre, de nombreuses études montrent l'importance du rôle de la communication bactérienne dans ce processus. Certains auteurs ont démontré que le QS est impliqué dans différentes étapes du développement de biofilm telles que l'attachement, la maturation et la dispersion (Tableau 3) (Spoering and Gilmore, 2006; Solano *et al.*, 2014), tandis que d'autres ont trouvé des difficultés à exploiter la relation entre le QS et la formation du biofilm comme c'est mentionné dans la revue de Parsek et Greenberg (Parsek and Greenberg, 2005).

L'implication du QS dans la régulation de la formation de biofilm a été rapportée pour la première fois chez *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1998). Dans cette étude Davies *et al* ont montré que la souche mutée au niveau du gène *lasI* codant la synthèse de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, développe un biofilm plus fin et plus facile à décrocher que la souche sauvage et l'addition de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL restaure le phénotype normal. En revanche, la mutation au niveau du *rhII* codant la synthèse de la C<sub>4</sub>-HSL n'a aucun effet sur la formation du biofilm. Cela a conduit les auteurs à suggérer que le système *lasI*-3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL-*lasR* est indispensable pour le développement de l'architecture caractéristique du biofilm chez *P. aeruginosa*. Cet effet d'inhibition du développement ou de maturation du biofilm par inactivation du QS a été également montré chez plusieurs bactéries comme *Serratia liquefaciens* (Labbate *et al.*, 2004), *Bulkoldehria cepacia* (Huber *et al.*, 2001), *Klebsiella pneumoniae* (Balestrino *et al.*, 2005).

Plus récemment, des études sur les effets d'inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm montrent l'importance de ces systèmes de communication dans la régulation des gènes impliqués dans la formation du biofilm (Hirakawa and Tomita, 2013). L'étude réalisée par Ishida *et al* (Ishida *et al.*, 2007) a permis de montrer que l'utilisation de molécules de synthèse inhibitrices de récepteurs LasR et RhlR chez *P. aeruginosa* entraîne une inhibition de la formation du biofilm.

**Tableau 3.** Différentes implication du QS dans la formation de biofilm chez les bactéries (Aye, 2015).

| Bactérie | Signal QS | Synthase/ | Processus | Références |
|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|----------|-----------|-----------|-----------|------------|

|                                           |                                                   | Récepteur QS                         | contrôlé par le QS                 |                                                                  |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <i>Serratia liquefaciens</i> MG1          | C <sub>4</sub> -HSL                               | <i>swrI/swrR</i>                     | Attachement                        | (Labbate <i>et al.</i> , 2004)                                   |
| <i>Helicobacter Pylori</i> SD14           |                                                   | <i>luxS</i>                          | Attachement                        | (Cole <i>et al.</i> , 2004)                                      |
| <i>Salmonella thyphimurium</i>            |                                                   | <i>luxS</i>                          | Attachement                        | (Prouty <i>et al.</i> , 2002)                                    |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO1                 | 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL<br>C <sub>4</sub> -HSL | <i>lasI/lasR</i><br><i>rhlI/rhlR</i> | Maturation du biofilm              | (Davies <i>et al.</i> , 1998; Waters and Bassler, 2005)          |
| <i>S. liquefaciens</i> MG1                | C <sub>4</sub> -HSL                               | <i>bsmA</i> et<br><i>bsmB</i>        | Maturation du biofilm              | (Labbate <i>et al.</i> , 2004)                                   |
| <i>Burkholderia cepacia</i> H111          | C <sub>8</sub> -HSL                               | <i>cepI/cepR</i>                     | Maturation du biofilm              | (Huber <i>et al.</i> , 2001)                                     |
| <i>Vibrio cholerae</i> E1 Tor C6706str2   |                                                   | <i>luxO</i>                          | Repression du biofilm              | (Hammer and Bassler, 2003)                                       |
| <i>Bacillus subtilis</i> NCIB3610         |                                                   | <i>yveQ/yveR</i>                     | Maturation du biofilm /sporulation | (Branda <i>et al.</i> , 2001)                                    |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> A1            | C <sub>4</sub> -HSL                               | <i>ahyI/ahyR</i>                     | Maturation du biofilm              | (Swift <i>et al.</i> , 1999)                                     |
| <i>Streptococcus mutans</i> 25172 et GS-5 | AI-2                                              | <i>LuxS</i>                          | Maturation du biofilm              | (Merritt <i>et al.</i> , 2003)<br>(Yoshida <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Streptococcus</i> sp.                  | CSP                                               | <i>ComC</i>                          | Maturation du biofilm              | (Cvitkovitch <i>et al.</i> , 2003)                               |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1      | 7,8-cis-C <sub>14</sub> -HSL                      | <i>cerI/cerR</i>                     | Dispersion                         | (Puskas <i>et al.</i> , 1997)                                    |
| <i>Yersinia</i>                           | C <sub>8</sub> -HSL                               | <i>ypsI/ypsR</i>                     | Dispersion                         | (Atkinson <i>et</i>                                              |

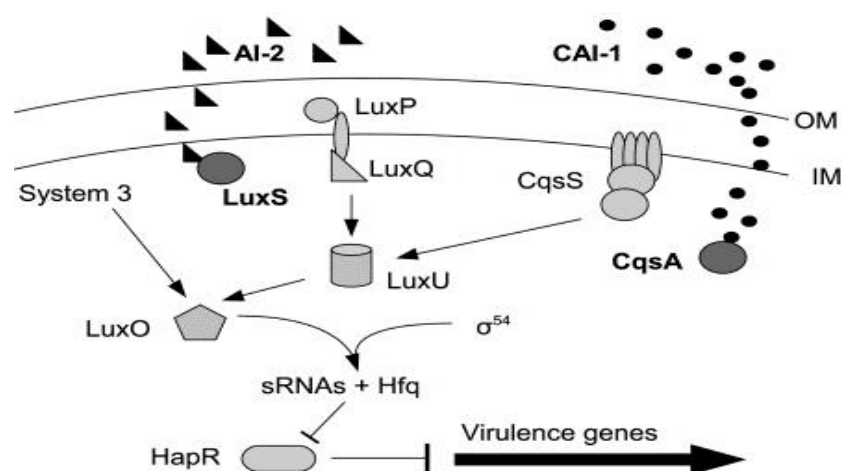
|                                              |             |             |            |                               |
|----------------------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------------------------|
| <i>Pseudotuberculosis</i><br>90/54           |             |             |            | <i>al.</i> , 1999)            |
| <i>Xanthomonas</i><br><i>campestris</i> 8004 | Facteur DSF | <i>rpfF</i> | Dispersion | (Dow <i>et al.</i> ,<br>2003) |

Comme expliqué plus haut, la formation du biofilm est un processus hautement régulé au niveau génétique. Plusieurs systèmes souvent connectés peuvent agir sur ce processus. Un exemple détaillé de cette interconnexion peut être illustré par le cas de la bactérie pathogène *V. cholerae*, responsable du choléra chez l'être humain. Cette bactérie existe principalement dans l'environnement marin et l'infection des humains se produit habituellement par l'ingestion d'eaux contaminées contenant des bactéries appartenant aux sérogroupes O1 et O139 de l'espèce *V. cholerae* (Suckow *et al.*, 2011). Après avoir traversé l'estomac, *V. cholerae* exprime un ensemble de facteurs de virulence qui permettent la colonisation des cellules épithéliales intestinales. Le principal facteur de colonisation est la toxine TCP (Toxin Coregulated Pilus). TCP favorise l'adhérence de *V. cholerae* à la muqueuse intestinale et la sécrétion ultérieure de la toxine cholérique, responsable de graves diarrhées, ce qui amène à une libération de la bactérie dans l'environnement (Li *et al.*, 2008). Le point critique du cycle d'infection de *V. cholerae* est la capacité de cette bactérie à alterner entre l'expression des gènes de virulence, nécessaires pour sa survie à l'intérieur de l'hôte et l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm, nécessaires pour sa survie dans son milieu marin (Faruque *et al.*, 2006).

Deux systèmes de signalisation contrôlent la transition de *V. cholerae* entre la vie planctonique et la vie en biofilm. Il s'agit des systèmes de communication QS et du système de signalisation c-di-GMP (Waters *et al.*, 2008).

Le CA1-1 et l'AI2 sont les deux molécules QS présentes chez *V. cholerae*. Elles sont synthétisées par CqsA et LuxS respectivement. La transduction de ces deux signaux est réalisée par les mêmes protéines régulatrices appelées LuxU et LuxO (Figure 30) (Duan et March, 2010). À faible densité cellulaire, les récepteurs de ces deux molécules signal (CqsS et LuxP/Q) fonctionnent comme des kinases, induisant la phosphorylation de la protéine LuxO. LuxO phosphorylée inhibe alors l'expression de HapR, régulateur majeur du mécanisme du QS, par l'augmentation de l'expression des petits ARN (sARN) qui inhibent la traduction des ARNm de *hapR*. Cela favorise l'expression de gènes spécifiques tels que les gènes requis

pour la formation de biofilm et la production des facteurs de virulence (Figure 25) (Waters *et al.*, 2008). Cependant, à forte densité cellulaire, les récepteurs CqsS et LuxP/Q fonctionnent comme des phosphatases, ce qui amène à une activation de l'expression de *hapR* par un mécanisme de transduction, entraînant la déphosphorylation de LuxO et par suite l'inhibition de la synthèse des sARN. HapR permet, en se liant à l'ADN, de réguler l'expression de gènes spécifiques des fortes densités cellulaires. Il inhibe l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm et des gènes de virulence, ce qui favorise la dispersion de *V. cholerae* (figure 30) (Waters *et al.*, 2008).



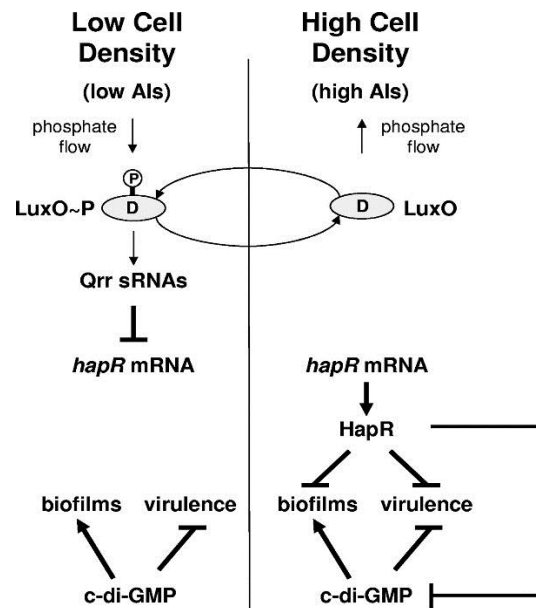
**Figure 30.** Présentation des systèmes QS chez *V. cholerae* (Duan and March, 2010).

*V. cholerae* possède deux systèmes QS. Il s'agit du système AI2 et du système CAI-1 composés de LuxS/AI2/LuxPQ et CqsA/CAI-1/CqsS comme synthase/molécule signal/récepteur respectivement. Ces deux systèmes régulent à haute densité cellulaire l'expression génétique de *V. cholerae* dont les gènes impliqués dans la synthèse des facteurs de virulence.

Conformément à ce qui est connu chez d'autres bactéries, le c-di-GMP contrôle la transition entre l'état planctonique et sessile chez *V. cholerae*. Une concentration élevée de c-di-GMP stimule la formation du biofilm et inhibe la virulence. Une faible concentration inhibe la formation du biofilm et induit la mobilité et la virulence (Tischler and Camilli, 2005).

Waters *et al.*, ont montré que l'expression de *hapR* chez *V. cholerae* à forte densité cellulaire inhibe la formation du biofilm par deux mécanismes. D'une part, HapR active l'expression des gènes codant pour des enzymes qui dégradent le c-di-GMP et d'autre part diminue l'expression du facteur transcriptionnel activateur du biofilm nommé VpsT. L'expression de *vpsT* est induite normalement par une forte concentration de c-di-GMP. Par conséquent, le QS contrôle la formation du biofilm chez *V. cholerae* via HapR d'une façon directe et indirecte en diminuant l'expression de VpsT et la concentration intracellulaire de c-di-GMP respectivement (Figure 31) (Waters *et al.*, 2008). À noter que d'autres protéines

kinases membranaires, CqsR et VpsS, ont été découvertes récemment. Celles-ci participent à la phosphorylation/déphosphorylation de LuxO en réponse à des molécules différentes de CAI-1 et AI2 (Jung *et al.*, 2015).



**Figure 31.** Modèle simplifié de l'interaction entre QS et c-di-GMP dans la régulation de l'expression génétique chez *V. cholerae* (Waters *et al.*, 2008).

À faible concentration d'Ais (faible concentration cellulaire) (à gauche), LuxO est phosphorylée, ce qui entraîne une inhibition de la traduction de *hapR* par synthèse des sARN qui modifient les ARNm de *hapR*. À forte concentration d'Ais (forte concentration cellulaire) (à droite), LuxO est déphosphorylé, ce qui entraîne une stabilisation des ARNm de *hapR*. HapR réprime à la fois la formation du biofilm et l'expression des facteurs de virulence. HapR inhibe la formation du biofilm à la fois directement et indirectement en réduisant la quantité de c-di-GMP intracellulaire.



### 3. Bactéries biosenseurs

Comme explicité plus haut, les différents systèmes de QS peuvent réguler plusieurs processus bactériens y compris l'expression de gènes de virulence et de la formation du biofilm, pouvant être responsables tous deux de maladies chez l'être humain. L'une des conditions préalables pour contourner ce problème est de connaître le système utilisé et de détecter l'auto-inducteur en jeu. De nombreuses approches impliquent l'utilisation de souches appelées rapporteurs ou plus fréquemment biosenseurs ont été mises en évidence.

#### 3.1. Définition et différents types des bactéries biosenseurs

Un biosenseur QS est une souche qui permet une détection quantitative et/ou qualitative d'un signal QS grâce à l'émission d'un signal visible, mesurable et/ou quantifiable tel que la bioluminescence ou la production de la violacéine (Kalia, 2013). Au cours de la dernière décennie, plusieurs biosenseurs ont été développés pour détecter les différents auto-inducteurs et en particulier ceux de type 1 (AHL) et de type 2 (AI2) (Tableau 4).

En général, les bactéries biosenseurs sont des souches contenant un système rapporteur (operon *vio*, *luxCDABEG*, *lacZ*...) et dépourvues d'un gène codant pour une synthèse QS (*luxI*, *luxS* ou autre selon le cas). Elles peuvent être classées en trois catégories :

- La première catégorie regroupe les souches portant une mutation au niveau de la synthèse QS à partir de bactéries qui ont naturellement un gène rapporteur (phénotype détectable) connu pour être sous la dépendance du QS. C'est le cas par exemple de *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997). CV026 porte une mutation du gène *cvil* (homologue *luxI*) de la souche sauvage *C. violaceum* ATCC 12472, produisant normalement la C<sub>6</sub>-HSL qui régule l'expression de l'operon *vio* responsable de la sécrétion de la violacéine (coloration pourpre). Par conséquent, la souche biosenseur CV026 n'est capable de synthétiser la violacéine qu'en réponse à une C<sub>6</sub>-HSL exogène.
- La deuxième catégorie regroupe les bactéries mutées par inactivation de la synthèse QS et par l'introduction d'un gène rapporteur exogène tel que *lacZ* (gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase) dont l'expression est contrôlée par l'activation du récepteur QS suite à la détection d'un auto-inducteur exogène. C'est le cas de la bactérie biosenseur *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) (Fuqua and Winans, 1994). Cette bactérie biosenseur est construite à partir de la souche sauvage *A. tumefaciens* R10 possédant un système AHL actif (TraI/3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL/TraR). C'est une bactérie pathogène des plantes chez lesquelles elle cause la tumeur de la galle du collet. Cette pathogénicité

est contrôlée par le QS, notamment les gènes *traI/traR* situés sur un plasmide nommé Ti (*tumor-inducing*) (Krenek *et al.*, 2015). A136 (pCF218) (pCF372) est donc mutée au niveau du gène *traI* et ne peut pas produire donc d'AHL. Le plasmide pCF218 contient le gène *traR* associé au promoteur *tetR* inductible à la tétracycline. Le plasmide pCF372 contient le promoteur transcriptionnel de *traI* fusionné à *lacZ*. Le récepteur TraR se lie à l'AHL exogène et active l'expression de *traI-lacZ*. A136 (pCF218) (pCF372) devient bleue lors de la détection d'AHLs exogènes sur un milieu contenant le substrat chromogène de la  $\beta$ -galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal). La  $\beta$ -galactosidase est produite lors de l'activation de l'expression du gène *lacZ* par le complexe AHL-TraR (Stickler *et al.*, 1998).

- La troisième catégorie de biosenseurs implique la construction d'une souche recombinante initialement dépourvue d'un système QS actif, par l'introduction d'un plasmide recombinant portant les gènes nécessaires à la détection qualitative et/ou quantitative d'un auto-inducteur exogène. Par exemple, *Escherichia coli* JM109 (Winson *et al.*, 1998) transformée par le plasmide pSB1075 (*lasR-P<sub>lasI</sub>-luxCDABE*) qui porte le gène *lasR* de *P. aeruginosa* et le promoteur de *lasI* ainsi qu'une cassette *luxCDABE*, permet donc la détection phénotypique de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. LasR lie le 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL exogène et active l'expression de l'opéron *luxCDABE* par sa liaison au promoteur *P<sub>lasI</sub>*, ce qui se matérialise par l'émission de la bioluminescence.

Du fait du caractère universel d'AI2 chez toutes les bactéries qui le synthétisent, seuls deux biosenseurs AI2 développés à partir de la souche sauvage *V. harveyi* BB120 sont utilisés principalement dans la détection de cette molécule signal. Il s'agit de *V. harveyi* BB170 (*luxN::Tn5 Kan*) et *V. harveyi* MM32 (*luxN::Cm, luxS::Tn5 Kan*). La différence entre ces deux souches est la présence ou l'absence respectivement du gène codant pour la synthase d'AI2 (LuxS). L'addition d'AI2 exogène stimule donc la bioluminescence de la souche BB170 déjà lumineuse par l'expression de son système AI2, et induit celle de MM32 qui n'est pas bioluminescente (Miller *et al.*, 2004). Cependant, la découverte et le développement des biosenseurs AHL ne cessent d'évoluer tout d'abord du fait de la diversité des molécules d'AHLs dans l'environnement (notamment en milieu marin), mais aussi à cause de la spécificité relative du récepteur LuxR pour une molécule ou pour un ensemble des molécules d'AHLs (Tableau4).

..

**Tableau 4.** Caractéristiques de quelques biosenseurs utilisés pour l'induction du QS.

| Souche                        | Modification génétique                            | Système rapporteur | phénotype       | AHLs reconnues                                                | Récepteur | Références                       |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------|
| <b>Courtes chaînes d'AHLs</b> |                                                   |                    |                 |                                                               |           |                                  |
| <i>C. violaceum</i> CV026     | <i>cviI::Tn5</i>                                  | Opéron <i>vio</i>  | Violacéine      | C <sub>4</sub> à C <sub>6</sub> -HSLs                         | CviR      | (McClellan <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>E. coli</i> JM109          | pSB401 ( <i>luxR-P<sub>luxI</sub>-luxCDABE</i> )  | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | 3-oxo-C <sub>4</sub> à C <sub>6</sub> -HSL                    | LuxR      | (Winson <i>et al.</i> , 1998)    |
| <i>E. coli</i> JM109          | pSB406 ( <i>rhIR-P<sub>rhII</sub>-luxCDABE</i> )  | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | C <sub>4</sub> -HSL                                           | RhlR      | (Winson <i>et al.</i> , 1995)    |
| <i>E. coli</i> JM109          | pSB536 ( <i>ahyR-P<sub>ahyI</sub>-luxCDABE</i> )- | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | C <sub>4</sub> -HSL                                           | AhyR      | (Swift <i>et al.</i> , 1997)     |
| <i>E. coli</i> JLD271         | pAL101 ( <i>rhIR-P<sub>rhII</sub>-luxCDABE</i> )  | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | C <sub>4</sub> -HSL                                           | RhlR      | (Lindsay and Ahmer, 2005)        |
| <i>E. coli</i> MT102          | pJBA130 ( <i>luxR-P<sub>luxI</sub>-gfpmut3</i>    | <i>gfp</i>         | Fluorescence    | 3-oxo-C <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> -HSLs | LuxR      | (Andersen <i>et al.</i> , 2001)  |
| <i>E. coli</i> VJS533         | pHV200I ( <i>luxR-P<sub>luxI</sub>-luxCDABE</i> ) | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | 3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL                                     | LuxR      | (Pearson <i>et al.</i> , 1994)   |
| <i>V. harveyi</i> BB886       | <i>luxPQ::Tn5</i>                                 | <i>luxCDABE</i>    | Bioluminescence | 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL                                      | LuxN      | (Bassler <i>et al.</i> , 1997)   |
| <b>Longues chaînes d'AHLs</b> |                                                   |                    |                 |                                                               |           |                                  |

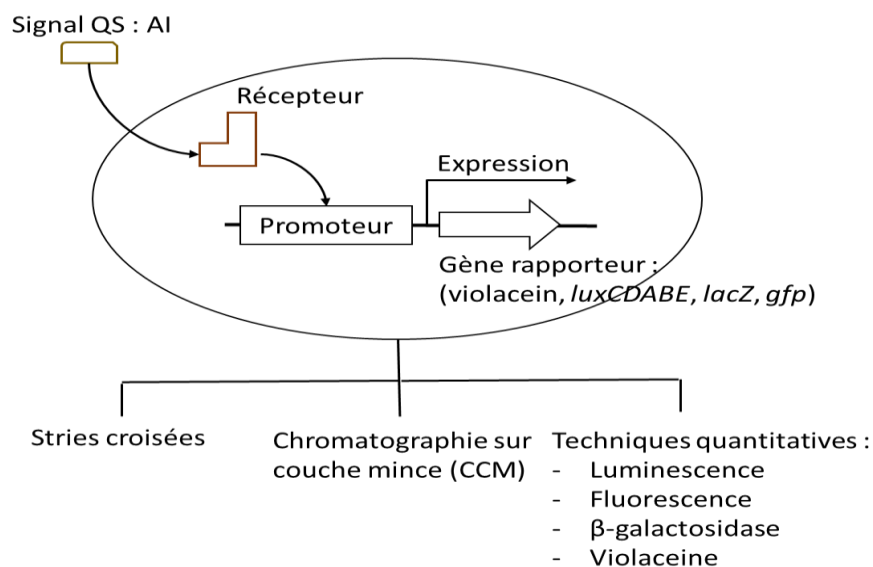
|                                                  |                                                   |                 |                          |                                                                                                                                                                                    |      |                                                           |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------|
| <b><i>E. coli</i> MG4</b>                        | pKDT17 ( <i>lasR-P<sub>lasI</sub>-lacZ</i> )      | <i>lacZ</i>     | Activité β-galactosidase | C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> -HSLs ;<br>3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL                                                                                                            | LasR | (Cha <i>et al.</i> , 1998)                                |
| <b><i>E. coli</i> JLD271</b>                     | pAL105 ( <i>lasR-P<sub>lasI</sub>-luxCDABE</i> )  | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence          | 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL                                                                                                                                                         | LasR | (Lindsay and Ahmer, 2005)                                 |
| <b><i>P. aeruginosa</i> PA14<br/><i>lasI</i></b> | pUCP18 ( <i>P<sub>rsaL</sub>-luxCDABE</i> )       | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence          | 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL                                                                                                                                                         | LasR | (Massai <i>et al.</i> , 2011)                             |
| <b><i>P. aeruginosa</i> PA14<br/><i>lasI</i></b> | pMS402 ( <i>P<sub>rsaL</sub>-luxCDABE</i> )       | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence          | 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL                                                                                                                                                         | LasR | (Massai <i>et al.</i> , 2011)                             |
| <b>Très Longues chaînes d'AHLs</b>               |                                                   |                 |                          |                                                                                                                                                                                    |      |                                                           |
| <b><i>S. meliloti</i></b>                        | <i>sinI::lacZ</i>                                 | <i>lacZ</i>     | Activité β-galactosidase | 3-oxo-(C <sub>14</sub> , C <sub>16</sub> )-HSLs ;<br>C <sub>16</sub> -HSL                                                                                                          | SniR | (Llamas <i>et al.</i> , 2004)                             |
| <b><i>E. coli</i> JM109</b>                      | pSB1075 ( <i>lasR-P<sub>lasI</sub>-luxCDABE</i> ) | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence          | 3-Oxo-C <sub>14</sub> ,<br>C <sub>16</sub> -HSLs,<br>C <sub>12</sub> à C <sub>16</sub> -<br>HSLs<br>C <sub>14</sub> :1 à C <sub>18</sub> :1-<br>HSLs<br>3-oxo-C <sub>16</sub> :1 à | LasR | (Winson <i>et al.</i> , 1998; Savka <i>et al.</i> , 2010) |

|                                        |                                                                                    |                  |                           |                                                                                                                                                             |                               |                                                |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------|
|                                        |                                                                                    |                  |                           |                                                                                                                                                             | 3-oxo-C <sub>18</sub> :1-HSLs |                                                |
| <b>Large gamme d’AHLs</b>              |                                                                                    |                  |                           |                                                                                                                                                             |                               |                                                |
| <i>A. tumefaciens</i><br>NT1           | pZLR4 ( <i>traR-P<sub>traCDG</sub>-traCDG::lacZ-</i> )                             | <i>lacZ</i>      | Activité β-galactosidase  | C <sub>6</sub> à C <sub>12</sub> -HSLs<br>3-OH (C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> )-HSLs<br>3-oxo-(C <sub>12</sub> , C <sub>14</sub> )-HSLs | TraR                          | (Cha <i>et al.</i> , 1998)                     |
| <i>A. tumefaciens</i><br>WCF47 ou A136 | pCF218 ( <i>P<sub>tetR</sub>-traR</i> )<br>pCF372 ( <i>P<sub>traI</sub>-lacZ</i> ) | <i>lacZ</i>      | Activité β-galactosidase  | C <sub>6</sub> à C <sub>14</sub> -HSLs<br>3-OH-(C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> )-HSLs<br>3-oxo-(C <sub>6</sub> ,C <sub>8</sub> )-HSLs;                     | TraR                          | (Zhu <i>et al.</i> , 1998<br>(Dickschat, 2010) |
| <b>3-hydroxy-AHLs</b>                  |                                                                                    |                  |                           |                                                                                                                                                             |                               |                                                |
| <i>P. fluorescens</i> 1855             | pSF105 ( <i>phzR</i> )<br>pSF107 ( <i>phzR-phzA-uidA::lacZ</i> )                   | <i>phzA-lacZ</i> | Activités β-galactosidase | 3-OH (C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> )-HSLs                                                                                              | PhzR                          | (Khan <i>et al.</i> , 2005)                    |
| <b>AI2</b>                             |                                                                                    |                  |                           |                                                                                                                                                             |                               |                                                |
| <i>V. harveyi</i> BB170                | <i>luxN::Tn5</i>                                                                   | <i>luxCDABE</i>  | Bioluminescence           | AI2                                                                                                                                                         | LuxP/<br>Q                    | (Miller <i>et al.</i> , 2004)                  |

|                                  |                                      |                 |                 |       |            |                                    |
|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-------|------------|------------------------------------|
| <b><i>V. harveyi</i> MM32</b>    | <i>luxN::Cm luxS::Tn5</i>            | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence | AI2   | LuxP/<br>Q | (Miller <i>et al.</i> , 2004)      |
| <b>Autres signaux</b>            |                                      |                 |                 |       |            |                                    |
| <b><i>V. harveyi</i> BB475</b>   | <i>luxM::Tn5</i><br><i>luxP::Tn5</i> | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence | CAI-1 | CqsS       | (Defoirdt <i>et al.</i> ,<br>2005) |
| <b><i>P. aeruginosa</i> PAO1</b> | <i>pqsA::luxCDABE</i>                | <i>luxCDABE</i> | Bioluminescence | PQS   | PqsR       | (Fletcher <i>et al.</i> ,<br>2007) |

### 3.2. Moyens d'utilisation des bactéries biosenseurs dans la détection d'auto-inducteur

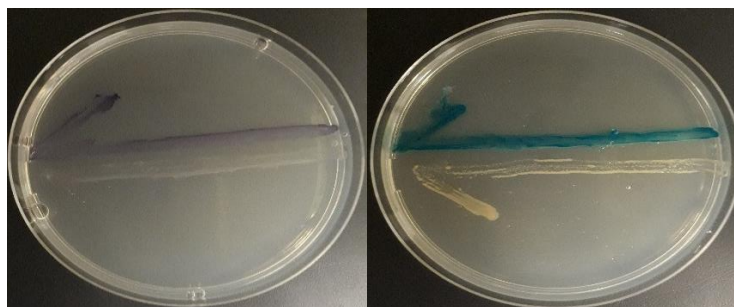
Plusieurs méthodes qualitatives et quantitatives ont été développées pour détecter et caractériser un auto-inducteur. Le choix d'une méthode de détection dépend du type d'étude en cours et du gène rapporteur présent chez la bactérie biosenseur utilisée (Figure 32) (Rai *et al.*, 2015).



**Figure 32.** Différentes techniques utilisées pour détecter un AI par une bactérie biosenseur.

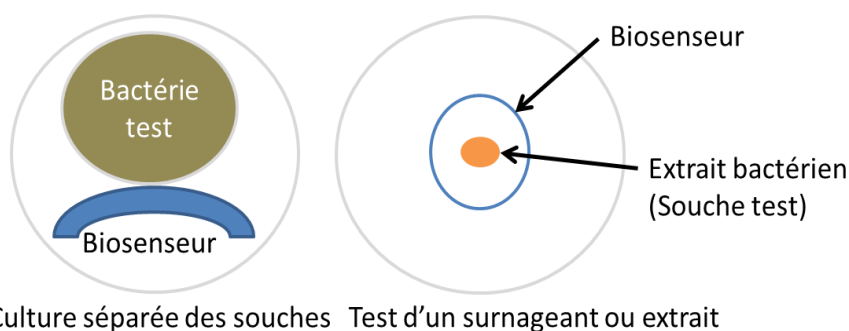
#### 3.2.1. Stries croisées

La méthode des stries croisées est une technique simple et rapide pour détecter qualitativement une production d'AI. Dans ce cas, la souche à tester et le biosenseur sont striés sur un milieu solide gélosé de sorte à former deux stries en forme de « T » (stries T). Si la souche biosenseur répond à une production d'AI par la souche test, elle produira un signal visible en fonction du gène rapporteur qu'elle possède (Steindler and Venturi, 2007). Des souches biosenseurs d'AHLs comme *C. violaceum* CV026 et les souches contenant une fusion *lacZ* comme *A. tumefaciens* A136 sont compatibles avec cette méthode ; dans le cas de la détection d'un AHL, CV026 produit la violaceine qui est un pigment violet visible alors qu'A136 active l'expression de *lacZ* codant pour l'enzyme β-galactosidase qui clive le X-Gal en donnant une coloration bleue (Figure 33) (Rai *et al.*, 2015).



**Figure 33.** Technique des stries croisées dans le cas d'une détection d'AHL en utilisant le CV026 (à gauche ; coloration violette) et l'A136 (à droite ; coloration bleue).

D'autres approches ont été développées également en utilisant ce type de bactéries biosenseurs. Ces sont des techniques qui permettent la détection d'AHLs synthétisées par des bactéries qui ne poussent pas sur le même milieu gélosé que les biosenseurs. La première technique consiste à faire pousser chaque bactérie (bactérie test et biosenseur) sur leur milieu de culture habituel et à mettre les géloses en contact lorsque les bactéries sont bien développées (figure 34) (Huang *et al.*, 2009; Ayé *et al.*, 2015). La deuxième technique consiste à tester un surnageant ou un extrait d'une culture de la souche test par un dépôt d'une goutte du surnageant (ou extrait) sur une boîte de Pétri contenant le milieu de culture de la bactérie biosenseur. Après séchage, le biosenseur est ensemencé en forme circulaire autour de la goutte (figure 28) (McLean *et al.*, 2004).



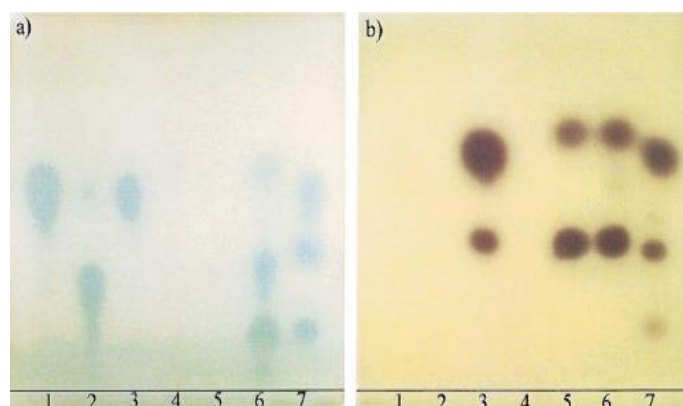
**Figure 34.** Techniques de la détection d'AHLs utilisées quand la bactérie test ne croit pas sur le même milieu que le biosenseur.

### 3.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode est plus sensible que la technique des stries croisées car elle permet de connaître la présence et la taille d'un AI produit par la souche testée (Figure 35). Dans cette méthode, les extraits organiques de cultures de bactéries testées en phase post exponentielle de croissance sont d'abord partiellement purifiés en chromatographie sur couche mince en phase inverse. Une fois que les extraits sont purifiés, la plaque de chromatographie est recouverte avec une suspension molle d'agar contenant le biosenseur approprié. Les souches



biosenseurs compatibles avec cette méthode sont les mêmes que ceux utilisés dans la méthode des stries croisées puisque cette approche est basée sur le même principe (Schaefer *et al.*, 2000).



**Figure 35.** Exemple de la chromatographie en couche mince avec *C. violaceum* CV026 (a) et *A. tumefaciens* pDZLR4 (b) (Ravn *et al.*, 2001).

### 3.2.3. Méthode basée sur la luminescence et la fluorescence

Cette méthode est compatible avec les biosenseurs utilisant le gène *luxCDABE* (bioluminescence) ou le gène *gfp* comme un gène rapporteur. Cette méthode est effectuée généralement dans des plaques de 24 ou 96 puits et permet la mesure d'induction de la luminescence ou de la fluorescence chez la souche biosenseur après un temps d'incubation donné suite à l'addition d'un surnageant ou d'un extrait de la souche testée sur une culture de la souche biosenseur. Cette technique peut donner une réponse à la fois qualitative et quantitative selon l'AI recherché et le biosenseur utilisé : si l'AI en question est un AI universel comme par exemple dans le cas d'AI2, PQS et CAI-1 ou si la bactérie biosenseur utilisée permet la détection d'une seule molécule d'AHL comme le *V. harveyi* BB886, une quantification sera possible en traçant une courbe standard de la relation dose réponse. Par contre la réponse reste qualitative dans le cas d'utilisation d'un biosenseur qui répond à plusieurs molécules d'AHLs comme *E. coli* JM109 pSB1075 (Tableau 4) (Rai *et al.*, 2012; Ke *et al.*, 2015).

## 4. Quorum Quenching (QQ)

Le QQ correspondant à l'inhibition du *quorum sensing* (QSI) est une nouvelle stratégie prometteuse pour lutter contre la virulence et les biofilms bactériens dans de nombreux domaines tels que l'environnement marin et le secteur médical (Defoirdt *et al.*, 2004). Plusieurs substances QQ ont été identifiées à partir de diverses sources et organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les algues, les éponges ainsi que les plantes et les animaux (Kalia, 2013). Toutes ces substances ont comme cible une ou plusieurs étapes conservées dans les différents systèmes de QS telles que la synthèse d'AI, son accumulation dans le milieu extracellulaire et sa détection ensuite par son récepteur. Pour cela, trois catégories de QSI ont été identifiées (Figure 36) (Lade *et al.*, 2014a):

- i. Inhibition de la synthèse d'AI par interférence avec la synthase
- ii. Inactivation d'AI par des méthodes métaboliques, chimiques ou enzymatiques
- iii. Interférence avec la détection d'AI ou inhibition de la formation du complexe AI/Récepteur

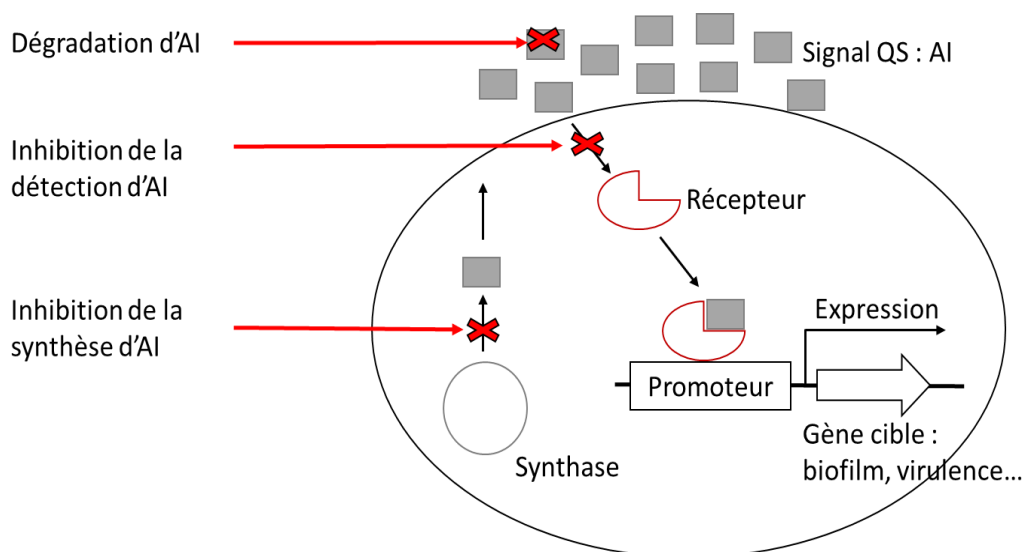


Figure 36. Les principales stratégies du *Quorum Quenching*.

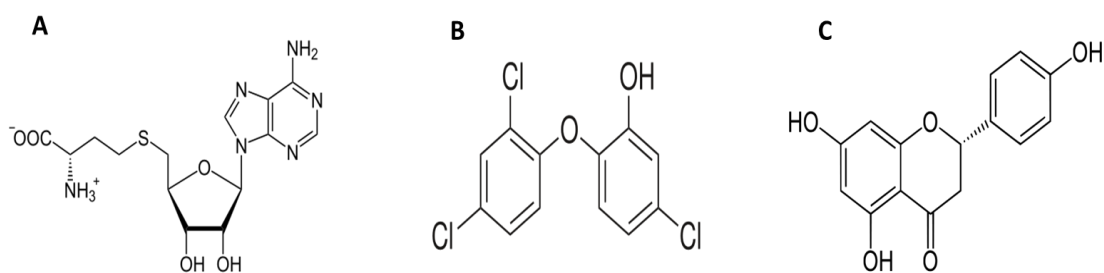
### 4.1. Inhibition de la synthèse d'auto-inducteur

L'inhibition de la synthèse d'AI semble être une approche simple pour bloquer le système QS afin de contrôler les infections et la formation de biofilm chez les bactéries. En effet, si aucun signal n'est synthétisé, il n'y a aucune possibilité de liaison au récepteur et les gènes sous contrôle du QS ne sont donc pas exprimés. Bien que les approches d'inhibition de la synthèse du signal soient beaucoup moins nombreuses que les deux autres citées ci-dessus,

cette approche est réalisable et efficace à la fois *in vitro* et *in vivo* pour plusieurs types d'auto-inducteurs (LaSarre and Federle, 2013).

#### 4.1.1. Inhibition de la synthèse d'AHL

Puisque la molécule d'AHL est synthétisée à partir de SAM et d'acyl-ACP sous l'action de LuxI, l'inhibition de la production de ce signal pourrait théoriquement se faire par interférence avec la biosynthèse de SAM et d'acyl-ACP ou l'inactivation de l'enzyme synthase LuxI (Parsek *et al.*, 1999; Hoang and Schweizer, 1999; Watson *et al.*, 2002; Geske *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2011; Bouyahya *et al.*, 2017). Parsek *et al* ont montré qu'un analogue de SAM comme la S-adénosylhomocystéine (Figure 37A) pourrait inhiber l'activité de l'homologue LuxI (RhII) chez *P. aeruginosa*, à plus de 97% (Parsek *et al.*, 1999). D'autre part, l'étude de Hoang et Schweizer (Hoang and Schweizer, 1999) s'est focalisée sur FabI (énoyl-ACP réductase), une enzyme bactérienne impliquée dans la phase finale de la biosynthèse d'acyl-ACP. Les auteurs dans cette étude ont montré que le triclosan (un biocide) (Figure 37B) inhibe la synthèse de C<sub>4</sub>-HSL chez *P. aeruginosa* par inhibition de FabI et qu'une mutation de *fabI* permet de diminuer à 50% la synthèse de C<sub>4</sub>-HSL. De plus, certaines molécules naturelles ont été identifiées pour leur activité inhibitrice de la synthèse d'AHL telles que la naringinine (Figure 37C) appartenant à la famille des flavanones (un sous-groupe de flavonoïdes) qui peut réduire la production de la pyocyanine et de l'élastase en inhibant la synthèse de de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et de la C<sub>4</sub>-HSL chez *P. aeruginosa* (Bouyahya *et al.*, 2017).



**Figure 37.** La structure moléculaire de (A) S-adénosylhomocystéine, (B) triclosan et (C) naringinine.

#### 4.1.2. Inhibition de la synthèse d'AI2

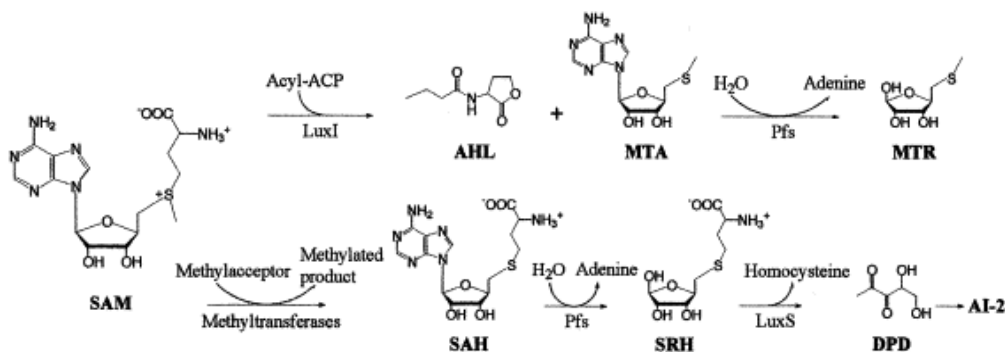
La molécule signal AI2 est produite par les cellules bactériennes à partir du précurseur SAH par l'action de deux enzymes qui fonctionnent d'une manière successive. La nucléosidase Pfs qui génère le SRH à partir de SAH et le LuxS qui clive l'homocystéine à partir de SRH pour donner le DPD (précurseur d'AI2 qui est instable et réalise alors une réaction de cyclisation spontanée en donnant l'AI2) (Figure 38) (Challan Belval *et al.*, 2006).

L'inhibition de la synthèse d'AI2 pourrait donc se faire par l'inhibition de l'action de l'un de ces deux enzymes (Roy *et al.*, 2011). Dans ce paragraphe, seule l'inhibition de LuxS est discutée. Le cas de Pfs sera discuté dans le paragraphe suivant du fait de l'implication de cette enzyme dans la synthèse de deux types d'auto-inducteurs AHL et AI2.

Les études concernant l'inhibition de LuxS sont peu nombreuses. Alfaro *et al* ont publié en 2004 la première étude d'inhibition *in vitro* de LuxS par l'utilisation de deux analogues de SRH, la S-anhydroribosyl-L-homocystéine et la S-homoribosyl-L-cystéine qui interfèrent avec le mécanisme catalytique de LuxS (Alfaro *et al.*, 2004). Après cette étude, plusieurs analogues SRH ont été développés (Shen *et al.*, 2006; Wnuk *et al.*, 2009; Malladi *et al.*, 2011; Chbib, 2017). Les inhibiteurs les plus efficaces sont l'acide (2S)-2-amino-4-[(2R,3S)-2,3-dihydroxy-3-N-hydroxycarbamoylpropylmercapto] butyrique et l'acide (2S)-2-amino-4-[(2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-N-hydroxycarbamoylpropylmercapto] butyrique (Shen *et al.*, 2006).

#### 4.1.3. Inhibition de la synthèse d'AHL et d'AI2 par inhibition de Pfs

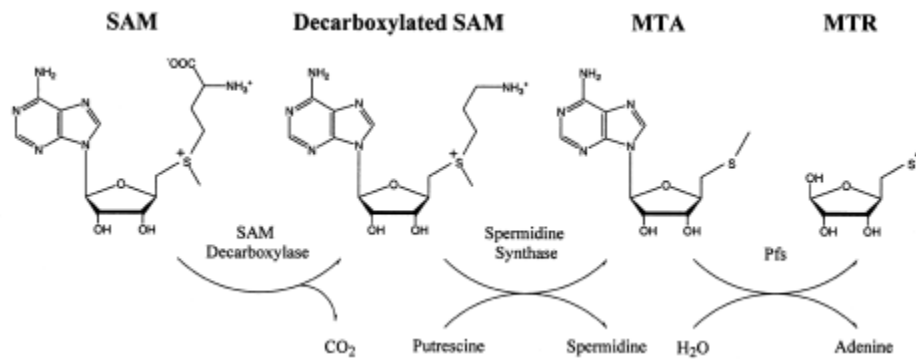
Les deux auto-inducteurs AHL et AI2 sont synthétisés à partir de SAM par deux chaînes des réactions enzymatiques différentes. Pfs est une enzyme impliquée dans ces deux voies de synthèse (figure 38) (Bassler, 2002) : dans le cas d'AHL, c'est le Pfs qui clive l'adénine à partir de methylthioadénosine (MTA), un produit secondaire de l'action de LuxI sur la SAM et est connu comme un inhibiteur de la voie de synthèse d'AHL. Dans le cas d'AI2, Pfs est l'enzyme responsable de la génération de SRH (substrat de LuxS) à partir de SAH.



**Figure 38.** les voies de synthèse d'AHL et d'AI2 à partir de SAM et l'implication de Pfs dans ces deux voies de synthèse (Bassler, 2002).

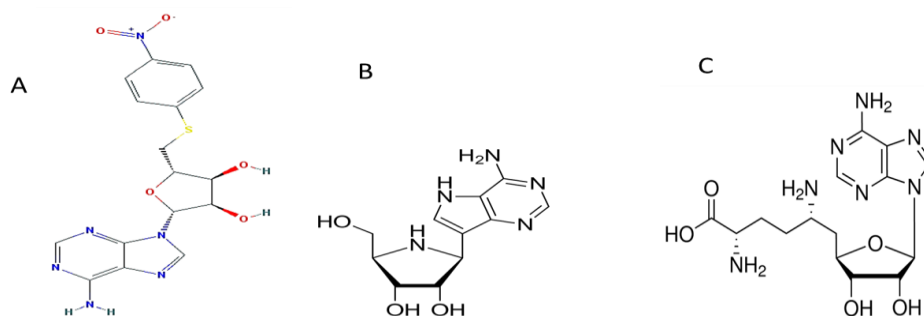
Un inhibiteur de Pfs pourrait alors inhiber la production d'AHL et d'AI2, mais il pourrait aussi interférer avec des voies métaboliques importantes dans la cellule bactérienne telles que la voie de la synthèse de polyamines et la régénération de la méthionine dans

laquelle le MTA et la SAH produits peuvent avoir des effets toxiques (Figure 39). Ceci entraînerait une inhibition de la croissance cellulaire et un possible développement de résistance bactérienne contre cet inhibiteur (Schauder *et al.*, 2001; Parveen and Cornell, 2011).



**Figure 39.** Implication de Pfs dans la voie de la synthèse de polyamine (Schauder *et al.*, 2001).

Des analogues MTA ont été identifiés comme des inhibiteurs de Pfs. Comel *et al* ont démontré que des MTA acyle ou aryle substitués tels que le 5'-(p-nitrophenyl)thioadenosine (Figure 40A) peuvent agir comme des inhibiteurs puissants de Pfs (Cornell *et al.*, 1996). D'autre part, des analogues d'adénosine tels que l'immuciline A (Figure 40B) et ses dérivés peuvent inhiber à la fois la synthèse d'AHL et d'AI2 en interférant avec le Pfs. Cet effet a été observé chez de nombreuses bactéries pathogènes telles que *E. coli* entérohémorragique, *V. cholerae* et *P. aeruginosa* (Gutierrez *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2015). Récemment, Yadav *et al* ont montré que la sinefugine (Figure 40C), un analogue commercial du SAM, inhibe la synthèse d'AI2 chez *Streptococcus pneumoniae* en diminuant à la fois l'expression de Pfs et de LuxS. Ceci entraîne une inhibition de la formation de biofilm *in vitro* et de la colonisation *in vivo* chez *S. pneumoniae* (Yadav *et al.*, 2014)



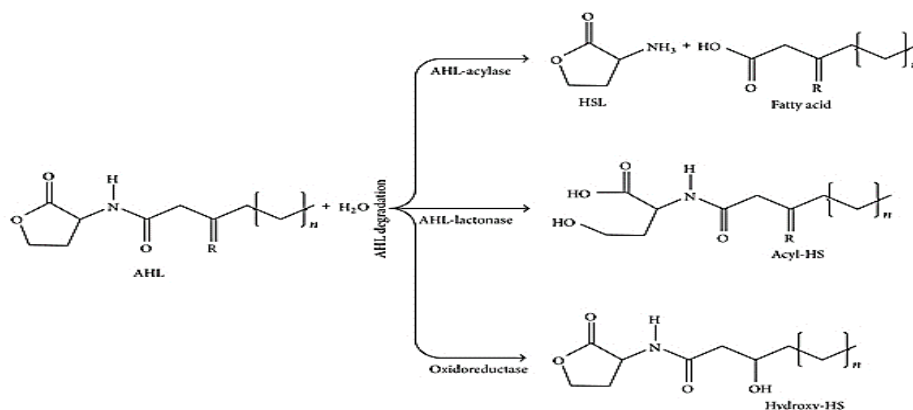
**Figure 40.** Structure moléculaire de (A) 5'-(p-nitrophenyl)thioadenosine, (B) immuciline A, (C) sinefugine.

## 4.2. Inactivation d'auto-inducteur

L'une des stratégies QSI la plus étudiée à ce jour est l'inactivation de la molécule signal. La dégradation enzymatique d'auto-inducteur est l'approche la plus intéressante.

### 4.2.1. Dégradation et inactivation enzymatique d'AHLs

Il existe trois classes d'enzymes connues qui ciblent les AHLs. Il s'agit de la lactonase, l'acylase et l'oxydoréductase (Figure 41). Les AHL-lactonases hydrolysent la liaison ester du cycle lactone des AHLs aboutissant à des molécules inactives dépourvues du cycle lactone. L'hydrolyse de ce cycle peut également se produire spontanément à pH basique et le cycle lactone peut être reconstitué à pH acide. Généralement, les AHLs-lactonases ont une spécificité de substrat très étendue du fait de la conservation du cycle lactone cible parmi les différentes molécules d'AHLs identifiées. Les AHLs-acylases hydrolysent la liaison acyle-amide entre la chaîne d'acyle et le cycle d'homosérine lactone de la molécule d'AHL d'une manière irréversible. Elles libèrent donc la chaîne d'acide gras et le cycle d'homosérine lactone, incapables d'activer chacun le QS. Contrairement aux lactonases, les acylases présentent une spécificité vis-à-vis des AHLs basée sur la longueur et la substitution en position 3 de la chaîne d'acyle. Les oxydoréductases ne dégradent pas les AHLs mais elles les modifient en une forme inactive en oxydant ou en réduisant la chaîne d'acyle. Elles sont les moins étudiées et les moins abondantes parmi ces classes d'enzymes (LaSarre and Federle, 2013; Lade *et al.*, 2014a; B. Rémy *et al.*, 2016).



**Figure 41.** Mécanismes de dégradation ou d'inactivation d'AHLs par les enzymes de QQ : AHL-acylase, AHL-lactonase et oxydoréductase (Lade *et al.*, 2014b).

#### 4.2.1.1. AHL-Lactonases

La production de lactonases par les bactéries pourrait être une stratégie de compétition dans l'environnement, leur permettant d'inhiber le développement d'autres bactéries ou de

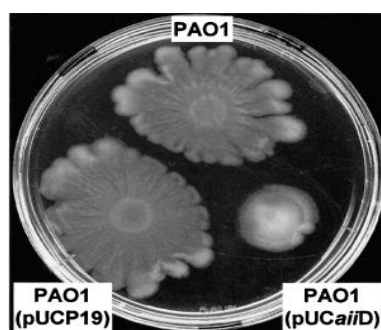
contrôler leur propre population, dans le but de gérer l'espace et la nourriture au sein de leur niche de développement (Dobretsov *et al.*, 2009). Le premier gène codant pour une lactonase a été identifié en 2000 par Dong *et al* chez plusieurs espèces appartenant au genre *Bacillus* comme *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2002). Ce gène nommé *aiiA* (autoinducer inactivation gene) cloné chez *Erwinia carotovora* réduit l'accumulation d'AHL, diminue la virulence et atténue alors la pathogénicité de cette souche contre la pomme de terre, l'aubergine, la carotte, le céleri, le chou-fleur et le tabac. D'autre part, Dong *et al* ont montré que la protéine AiiA purifiée dégrade en 40 minutes à une concentration de 50 ng/μl, la 3-oxo-C<sub>6</sub>-AHL, 3-oxo-C<sub>8</sub>-AHL et 3-oxo-C<sub>10</sub>-AHL ajoutées dans le milieu *in vitro* à une concentration de 40 μM (Dong *et al.*, 2000). D'autres lactonases ont été identifiées chez plusieurs bactéries Gram- telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Arthrobacter sp.* et *A. tumefaciens* (Tableau 5).

En plus des enzymes bactériennes décrites, des activités AHL-lactonases ont été constatées chez un ensemble d'enzymes issues de mammifères. Les paraoxonases 1, 2 et 3 (PON1 à 3) sont capables de dégrader la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et inhiber la formation du biofilm chez *P. aeruginosa in vitro* (Chun *et al.*, 2004; Ozer *et al.*, 2005; Devarajan *et al.*, 2013).

Récemment, une lactonase nommée SsoPOX-W263I a été isolée d'une bactérie volcanique nommée *Archaea Sulfolobus solfataricus*. Cette enzyme qui montre une résistance aux conditions extrêmes comme une température élevée et un contact avec les solvants organiques, inhibe la virulence de 51 souches cliniques de *P. aeruginosa* en diminuant la sécrétion de deux facteurs de virulence, les protéases et la pyocyanine, ainsi que la formation de biofilm (Benjamin Rémy *et al.*, 2016; Guendouze *et al.*, 2017). De part sa résistance aux conditions extrêmes, son utilisation s'avère prometteuse dans d'autres secteurs d'activité notamment dans le secteur marin ou son efficacité est à l'étude.

#### 4.2.1.2. AHL-Acylases

L'activité AHL-acylase a été décrite premièrement chez des *betaprotéobacteries* isolées du sol, notamment chez *Ralstonia sp.* qui exprime un gène nommé *aiiD*, codant pour un AHL-acylase, capable de dégrader *in vitro* des AHLs à chaînes latérales longues oxo-substituées. Comme dans le cas des AHL-lactonases, les acylases pourraient inhiber également plusieurs comportements bactériens en interférant avec le QS : l'expression d'*aiiD* chez *P. aeruginosa* PAO1 diminue l'accumulation de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, ce qui inhibe la mobilité et la production des facteurs de virulence chez cette souche transformée par un plasmide contenant le gène *aiiD* (figure 42) (Lin *et al.*, 2003).



**Figure 42.** Inhibition de la mobilité de *P. aeruginosa* PAO1 par l'expression d'*aaiD* (Lin *et al.*, 2003).

D'autres AHL-acylases ont été identifiés également chez plusieurs bactéries Gram- et Gram+ (Tableau 5). Nommément, la protéine PvdQ chez *P. aeruginosa* PAO1, capable de dégrader des AHLs à chaînes acyles formées d'au moins huit carbones. Papaioannou *et al* ont montré que la surexpression de *pvdQ* ou l'addition exogène de la protéine PvdQ purifiée inhibe la virulence de PAO1 et donc sa pathogénicité contre le nématode *Caenorhabditis elegans* (Papaioannou *et al.*, 2009).

#### 4.2.1.3. AHL-oxidoréductases

Les AHL-oxidoréductases ciblent la chaîne d'acyle par des activités oxydatives ou réductrices et catalysent ainsi une modification de la structure chimique du signal mais pas sa dégradation (Figure 34). Une telle modification pourrait affecter la spécificité et la reconnaissance du signal AHL, perturbant ainsi l'activation des gènes régulés par QS (Chan *et al.*, 2011). A ce jour, deux AHL-oxidoréductases ont été identifiées (Tableau 5) : le CYP102A1 identifié chez *Bacillus megaterium* (Chowdhary *et al.*, 2007) et le BpiB09 identifié par une analyse métagénomique du sol. La surexpression de *bpiB09* chez *P. aeruginosa* PAO1 entraînait une réduction significative de la virulence, la motilité, la formation du biofilm et la pathogénicité de PAO1 contre *C. elegans* par l'inhibition de QS (Patrick Bijtenhoorn *et al.*, 2011).

**Tableau 5.** Les trois familles d'enzymes qui dégradent ou inactivent les AHLs (LaSarre and Federle, 2013). ND : non déterminé

| Famille  | Protéine | Source               | Spécificité                                               | Références                   |
|----------|----------|----------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|
| Acylases | PvdQ     | <i>P. aeruginosa</i> | $\geq 7$ carbones                                         | (Sio <i>et al.</i> , 2006)   |
|          | QuiP     | <i>P. aeruginosa</i> | $\geq 7$ carbones                                         | (Huang <i>et al.</i> , 2006) |
|          | AiiD     | <i>Ralstonia</i> sp. | C <sub>4</sub> , 3-oxo-C <sub>8</sub> , C <sub>12</sub> - | (Lin <i>et al.</i> , 2003)   |



|            |      | HSLs                                  |                                                                     |
|------------|------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|            | Aac  | <i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 | $\geq 7$ carbones (Chen <i>et al.</i> , 2009)                       |
|            | AhlM | <i>Streptomyces</i> sp.               | $\geq 6$ carbones, non substituées (Park <i>et al.</i> , 2005)      |
|            | AiiC | <i>Anabaena</i> sp.                   | 4–14 carbones (Romero <i>et al.</i> , 2008)                         |
|            | Aac  | <i>Shewanella</i> sp.                 | $\geq 8$ carbones, non substituées (Morohoshi <i>et al.</i> , 2008) |
|            | HacA | <i>P. syringae</i> B728a              | $\geq 8$ carbones non substituées (Shepherd and Lindow, 2009)       |
|            | HacB | <i>P. syringae</i> B728a              | $\geq 6$ carbones (Shepherd and Lindow, 2009)                       |
|            | HacB | <i>P. aeruginosa</i>                  | $\geq 6$ carbones (Wahjudi <i>et al.</i> , 2011)                    |
|            | ND   | <i>Variovorax paradoxus</i>           | 4–14 carbones (Leadbetter and Greenberg, 2000)                      |
|            | ND   | <i>Comamonas</i> sp. strain D1        | 4–16 carbones (Uroz <i>et al.</i> , 2007)                           |
|            | ND   | <i>Rhodococcus erythropolis</i>       | 6–14 carbones (Uroz <i>et al.</i> , 2005)                           |
| Lactonases | AiiA | <i>Bacillus</i> sp.                   | Spécificité étendue (Dong <i>et al.</i> , 2002)                     |
|            | AiiB | <i>A. tumefaciens</i>                 | Spécificité étendue (Carlier <i>et al.</i> , 2003)                  |
|            | AttM | <i>A. tumefaciens</i>                 | Spécificité étendue (Khan and Farrand, 2009)                        |
|            | AhlD | <i>Arthrobacter</i> sp.               | Spécificité (Park <i>et al.</i> , 2003)                             |

|        |                                         |                     |                                       |
|--------|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
|        |                                         | étendue             |                                       |
| AhlK   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC2241   | Spécificité étendue | (Park <i>et al.</i> , 2003)           |
| QsdR1  | <i>Rhizobium</i> sp.                    | Spécificité étendue | (Krysciak <i>et al.</i> , 2011)       |
| QlcA   | Métagénomique du sol                    | Spécificité étendue | (Riaz <i>et al.</i> , 2008)           |
| AidC   | <i>Chryseobacterium</i> sp.             | Spécificité étendue | (Wang <i>et al.</i> , 2012)           |
| QsdA   | <i>Rhodococcus erythropolis</i>         | Spécificité étendue | (Uroz <i>et al.</i> , 2008)           |
| AiiM   | <i>Microbacterium testaceum</i> StLB037 | Spécificité étendue | (Wang <i>et al.</i> , 2010)           |
| AidH   | <i>Ochrobactrum anthropi</i>            | Spécificité étendue | (Mei <i>et al.</i> , 2010)            |
| QsdH   | <i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i>   | Spécificité étendue | (Huang <i>et al.</i> , 2012)          |
| BpiB01 | Métagénomique du sol                    | Spécificité étendue | (Schipper <i>et al.</i> , 2009)       |
| BpiB04 | Métagénomique du sol                    | Spécificité étendue | (Schipper <i>et al.</i> , 2009)       |
| BpiB07 | Métagénomique du sol                    | Spécificité étendue | (Schipper <i>et al.</i> , 2009)       |
| DhlR   | <i>Rhizobium</i> sp.                    | Spécificité étendue | (Krysciak <i>et al.</i> , 2011)       |
| BpiB05 | Métagénomique du sol                    | Spécificité étendue | (P. Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2011) |
| PON1-3 | Cellules de                             | Spécificité         | (Khersonsky and                       |

|                 |              |                                |                     |                                                                                 |
|-----------------|--------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
|                 |              | mammifères                     | étendue             | Tawfik, 2005;<br>Draganov <i>et al.</i> ,<br>2005; Tavori <i>et al.</i> , 2008) |
|                 | SsoPox-W263I | <i>Sulfolobus solfataricus</i> | Spécificité étendue | (Benjamin Rémy <i>et al.</i> , 2016;<br>Guendouze <i>et al.</i> , 2017)         |
| Oxidoréductases | CYP102A1     | <i>Bacillus megaterium</i>     | Spécificité étendue | (Chowdhary <i>et al.</i> , 2007)                                                |
|                 | BpiB09       | Métagenomique du sol           | Spécificité étendue | (P. Bijtenhoorn <i>et al.</i> , 2011)                                           |

#### 4.2.2. Inactivation de l'auto-inducteur 2

Les études concernant l'inactivation de la molécule signal AI2 sont peu nombreuses par rapport à celles qui ciblent les AHLs. En fait, une seule enzyme capable d'inactiver l'AI2 a été identifiée. Il s'agit de LsrK, une kinase trouvée naturellement chez les *Enterobacteriaceae* où elle est responsable de la phosphorylation d'AI2 après leur internalisation dans les cellules via le transporteur Lsr comme cela a été décrit dans la partie 2.3.3 (Page 55). En outre, Roy *et al* ont montré que LsrK est capable de phosphoryler l'AI2 en milieu extracellulaire lorsqu'elle a été ajoutée *in vitro* avec de l'ATP sur des cultures séparées et des co-cultures d'*E. coli*, *S. typhimurium* et *V. harveyi*. L'AI2 phosphorylé est incapable d'être internalisé dans le cas d'*E. coli* et *S. typhimurium* et de se lier à son récepteur membranaire dans le cas de *V. harveyi*, ce qui inhibe la réponse QS et la communication bactérienne via l'AI2 (Taga *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2010) (Figure 37).

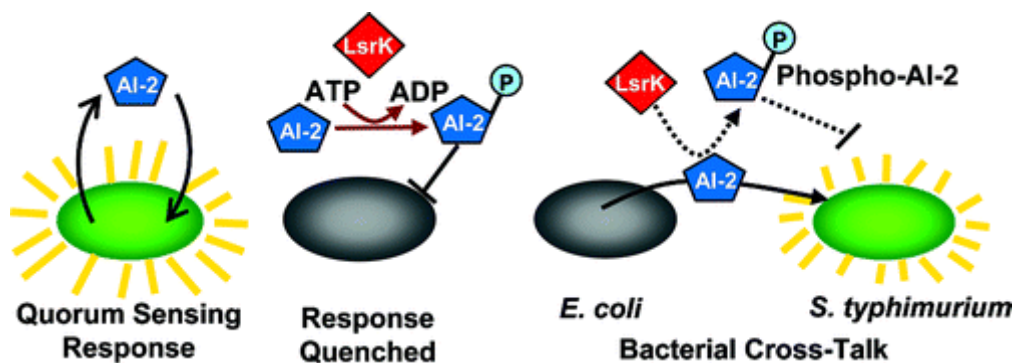


Figure 43. Inhibition de la réponse QS médiée par AI2 sous l'action de Lsrk (Roy *et al.*, 2010).

Généralement, chez les *Enterobacteriaceae*, AI2 est internalisé pour déclencher une réponse bactérienne QS dépendante. Lorsque AI2 est phosphorylé sous l'action de LsrK, son internalisation sera inhibée, ce qui empêche le déclenchement d'une réponse QS dépendante et donc l'établissement d'une communication bactérienne via AI2.

### **4.3. Inhibition de la détection d'auto-inducteur**

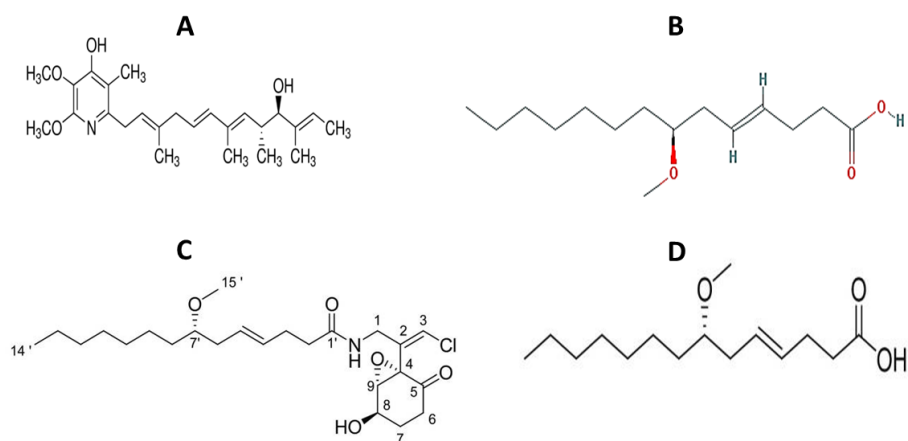
L'approche la plus utilisée et la plus étudiée dans les stratégies de QSI est l'utilisation des molécules qui miment l'auto-inducteur et bloquent ensuite la formation du complexe AI/récepteur, ce qui empêche l'activation du récepteur et inhibe alors la régulation génétique via le QS (LaSarre and Federle, 2013).

#### **4.3.1. Inhibition de la détection d'AHLs**

Plusieurs molécules qui interfèrent avec la liaison AHL/récepteur ont été identifiées. Ces molécules peuvent être naturelles, produites à la fois par des organismes procaryotes et eucaryotes ou chimiquement synthétisées. Elles ont pour rôle d'empêcher la fixation des AHLs sur le site du récepteur, en s'y fixant en lieu et place des AHLs (inhibition compétitive).

##### **4.3.1.1. Inhibiteurs naturels des récepteurs d'AHLs**

Les inhibiteurs naturels du récepteur AHL peuvent être sécrétés par des organismes procaryotes et eucaryotes tels que les bactéries, les cyanobactéries, les macroalgues, les éponges, les champignons et les plantes qui peuvent produire des métabolites secondaires agissant comme des molécules QSIs (Tableau 6) (Tang and Zhang, 2014; Asfour, 2017; Saurav *et al.*, 2017; Bouyahya *et al.*, 2017). Tous ces inhibiteurs arriveraient à mimer l'activité des signaux AHLs en inhibant les récepteurs, ce qui affecte le QS des bactéries. A noter que la plupart de ces composés ont une structure moléculaire proche d'AHL (Figure 44) et ils sont plutôt testés sur des bactéries biosenseurs chez qui ils inhibent l'induction de la réponse régulée par QS suite à l'addition exogène d'AHL. De plus, certaines molécules naturelles, dont le mode d'action est inconnu ont montré une activité inhibitrice des phénotypes régulés par QS chez plusieurs bactéries (voir tableau 6).



**Figure 44.** Structure moléculaire proche d’AHL des quelques inhibiteurs naturels de la détection d’AHLs. (A) Piéricidine A1, (B) Acide cis-9-octadecénoïque, (C) 8-epi-malngamide, (D) Acide lymbique.

Tableau 6. Quelques inhibiteurs naturels d'AHLs.

| Composé QSI                                      | Espèce                         | Bactérie testée                | Cible    | Test                                    | Références                                                    |
|--------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>Inhibiteurs synthétisés par des bactéries</b> |                                |                                |          |                                         |                                                               |
| <b>Piéricidine A1</b>                            | <i>Streptomyces sp.</i>        | <i>C. violaceum</i> CV026      | CviR     | Induction de la sécrétion de violacéine | (Ooka <i>et al.</i> , 2013)                                   |
| <b>N-(2'-phenylethyl)-isobutyramide</b>          | <i>Halobacillus salinus</i>    | <i>V. harveyi</i> BB120        | Inconnue | Induction de la bioluminescence         | (O'Neill <i>et al.</i> , 2009; Teasdale <i>et al.</i> , 2011) |
|                                                  |                                | <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 | CviR     | Sécrétion de violacéine                 |                                                               |
|                                                  |                                | <i>V. fischeri</i>             | LuxR     | Bioluminescence                         |                                                               |
| <b>Cyclo-L-proline-L-tyrosine</b>                | <i>Bacillus cereus</i> D28     | <i>C. violaceum</i> CV026      | Inconnue | Induction de la sécrétion de violacéine | (Teasdale <i>et al.</i> , 2011)                               |
| <b>Dicétopiperazines</b>                         | <i>Marinobacter sp.</i> SK-3   | <i>C. violaceum</i> CV017      | CviR     | Induction de la sécrétion de violacéine | (Abed <i>et al.</i> , 2013)                                   |
|                                                  |                                | <i>E. coli</i> pSB401          | LuxR     | Induction de la bioluminescence         |                                                               |
| <b>Yayurea A et B</b>                            | <i>Staphylococcus delphini</i> | <i>V. harveyi</i>              | LuxN     | Bioluminescence                         | (Chu <i>et al.</i> , 2013)                                    |
| <b>Acide cis-9-</b>                              | <i>Stenotrophomonas</i>        | <i>C. violaceum</i> CV026      | LuxR     | Induction de la sécrétion de            | (Singh <i>et al.</i> , 2013)                                  |

|                                                       |                                   |                                |          |                                         |                                          |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>octadecenoïque</b>                                 | <i>maltophilia</i> BJ01           |                                |          | violacéine                              |                                          |
|                                                       |                                   | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | Inconnue | Formation du biofilm                    |                                          |
| <b>Protoanemonine</b>                                 | <i>Pseudomonas spp.</i>           | <i>P. aeruginosa</i> PAO1      | LasR     | Expression des gènes régulés par QS     | (Bobadilla Fazzini <i>et al.</i> , 2013) |
| <b>Inhibiteurs synthétisés par des cyanobactéries</b> |                                   |                                |          |                                         |                                          |
| <b>Acide tumonoïque F</b>                             | <i>Blennothrix cantharidosmun</i> | <i>V. harveyi</i> BB120        | Inconnue | Bioluminescence                         | (Clark <i>et al.</i> , 2008)             |
| <b>8-epi-malyngamide C</b>                            | <i>Lyngbya majuscula</i>          | <i>E. coli</i> JM109 pSB1075   | LasR     | Bioluminescence                         | (Kwan <i>et al.</i> , 2010)              |
| <b>Acide lyngbique</b>                                |                                   |                                |          |                                         |                                          |
| <b>Acide lyngbyoïque</b>                              | <i>L. majuscula</i>               | <i>P. aeruginosa</i>           | LasR     | Synthèse de facteurs de virulence       | (Kwan <i>et al.</i> , 2011)              |
| <b>Malyngolide</b>                                    | <i>L. majuscula</i>               | <i>C. violaceum</i> CV017      | CviR     | Induction de la sécrétion de violacéine | (Dobretsov <i>et al.</i> , 2010)         |
| <b>Honaucines A-C</b>                                 | <i>Leptolyngbya crossbyana</i>    | <i>V. harveyi</i> BB120        | Inconnue | Bioluminescence                         | (Choi <i>et al.</i> , 2012)              |
|                                                       |                                   | <i>E. coli</i> MT102 pJBA132   | LuxR     | Induction de la fluorescence            |                                          |

|                                                       |                                     |                                   |      |                                                    |                                   |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Acide pitinoïque</b>                               | <i>Lyngbya sp.</i>                  | <i>P. aeruginosa</i>              | LasR | Synthèse de pyocyanine                             | (Montaser <i>et al.</i> , 2013)   |
| <b>Inhibiteurs synthétisés par des algues</b>         |                                     |                                   |      |                                                    |                                   |
| <b>Furanones halogénées</b>                           | <i>Delisea pulchra</i>              | <i>E. coli</i> MG4 pKDT17         | LuxR | Induction de la synthèse de $\beta$ -galactosidase | (Hentzer <i>et al.</i> , 2002)    |
|                                                       |                                     | <i>P. aeruginosa</i>              | LasR | Formation du biofilm                               |                                   |
| <b>betonicine, floridoside, et acide isethionique</b> | <i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i> | <i>A. tumefaciens</i> A136        | TraR | Induction de la synthèse de $\beta$ -galactosidase | (Liu <i>et al.</i> , 2008)        |
| <b>Inhibiteurs synthétisés par des éponges</b>        |                                     |                                   |      |                                                    |                                   |
| <b>Monoacetate et secomanoalide</b>                   | <i>Luffareilla variabilis</i>       | <i>P. aeruginosa</i> Tn5-LasB-gfp | LasR | Inhibition de la fluorescence                      | (Skindersoe <i>et al.</i> , 2008) |
| <b>Alcaloïdes (hymenialdisine)</b>                    | <i>Hymeniacidon aldis</i>           | <i>E. coli</i> pSB1075            | LasR | Induction de la bioluminescence                    | (Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)  |
|                                                       |                                     | <i>E. coli</i> pSB401             | LuxR |                                                    |                                   |
| <b>Inhibiteurs synthétisés par des plantes</b>        |                                     |                                   |      |                                                    |                                   |
| <b>Benzopyran (Deméthoxy enecaline)</b>               | <i>Baccharis cassinaefolia</i>      | <i>C. violaceum</i> CV017         | CviR | Induction de la sécrétion de violacéine            | (Dobretsov <i>et al.</i> , 2011)  |
|                                                       |                                     | <i>E. coli</i> pSB1075            | LasR | Induction de la bioluminescence                    |                                   |

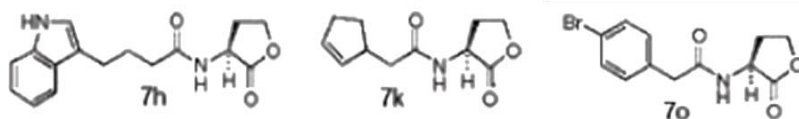


|                               |                               |                                 |         |                                                           |                                    |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                               |                               | <i>E. coli</i> pSB401           | LuxR    | Induction de la bioluminescence                           |                                    |
| <b>Eugenol</b>                | <i>Syzygium aromaticum</i>    | <i>P. aeruginosa</i> PAO1       | LasR    | Production de facteurs de virulence                       | (Zhou <i>et al.</i> , 2013)        |
|                               |                               | <i>C. violaceum</i> CV026       | CviR    | Induction de la sécrétion de violacéine                   |                                    |
| <b>L-Canavanine</b>           | <i>Medicago sativa</i>        | <i>C. violaceum</i> CV026       | CviR    | Induction de la sécrétion de violacéine                   | (Keshavan <i>et al.</i> , 2005)    |
|                               |                               | <i>Sinorhizobium meliloti</i>   | ExpR    | Production d'EPS                                          |                                    |
| <b>Sesquiterpene lactones</b> | <i>Sesquiterpene lactones</i> | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Inconnu | Formation du biofilm et synthèse de facteurs de virulence | (Amaya <i>et al.</i> , 2012)       |
| <b>curcumine</b>              | <i>Curcuma longa</i>          | <i>P. aeruginosa</i> PAO1       | Inconnu | Formation du biofilm                                      | (Packiavathy <i>et al.</i> , 2014) |
|                               |                               | <i>Proteus mirabilis</i>        | Inconnu | Formation du biofilm                                      |                                    |
|                               |                               | <i>Serratia marcescens</i>      | Inconnu | Formation du biofilm                                      |                                    |
|                               |                               | <i>C. violaceum</i> CV026       | CviR    | Induction de la sécrétion de violacéine                   |                                    |
| <b>Acide p-coumarique</b>     | Plusieurs plantes             | <i>C. violaceum</i> CV026       | CviR    | Induction de la sécrétion de violacéine                   | (Bodini <i>et al.</i> , 2009)      |

|  |                           |         |                                  |
|--|---------------------------|---------|----------------------------------|
|  | <i>P. aeruginosa</i> PAO1 | Inconnu | Formation du biofilm             |
|  | <i>E. coli</i> pSB401     | LuxR    | Induction de La bioluminescence  |
|  | <i>P. aeruginosa</i> PAO1 |         | Mobilité et formation du biofilm |
|  | <i>S. typhimurium</i>     |         |                                  |

#### 4.3.1.1. Inhibiteurs synthétiques des récepteurs d'AHLs

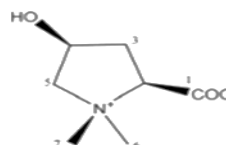
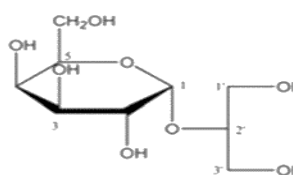
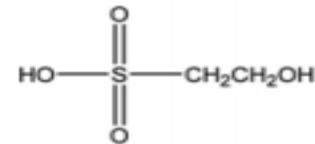
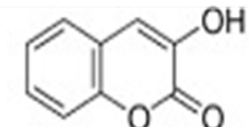
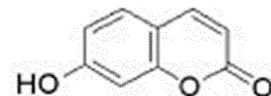
Les inhibiteurs naturels sont synthétisés généralement en faible quantité ou leur utilisation doit passer par une amélioration des conditions de production lorsque cela est possible. Cette faible production représente une limitation majeure pour les applications industrielles (Kalia, 2013). Pour cela, et en se basant sur la structure des molécules naturelles, plusieurs composés QSIs ont été synthétisés. Ces composés QSIs peuvent être la molécule naturelle elle-même ou ses dérivés. C'est le cas par exemple de la synthèse de coumarine et de ses dérivés (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; D'Almeida *et al.*, 2017). Un autre exemple comprend la synthèse d'analogues d'AHLs structurellement modifiés dans la chaîne latérale ou dans le cycle lactone responsable de la liaison avec les récepteurs d'AHLs. C'est le cas de la synthèse de plusieurs analogues (Figure 45) faite par Geske *et al* en se basant sur les structures d'AHLs connues telles que la 3-oxo-C<sub>6</sub>-AHL, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-AHL... (Geske *et al.*, 2005).

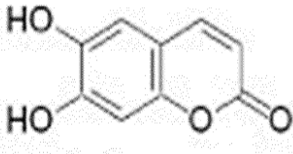
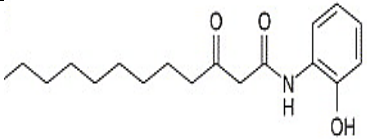
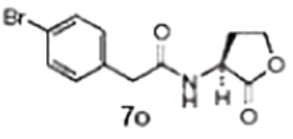
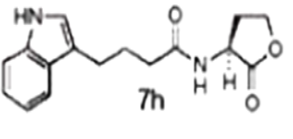
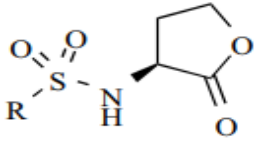


**Figure 45.** Structure moléculaire des analogues d'AHLs synthétisés par Geske *et al* (Geske *et al.*, 2005). (7h) indole-HSL, (7k) cyclopentène-HSL, (7o) Bromophényle-HSL.

Quelques composés synthétiques inhibiteurs de la liaison AHL/récepteur sont cités dans le tableau 7. Comme dans le cas des inhibiteurs naturels, le test des composés QSIs synthétiques se fait généralement avec des bactéries biosenseurs et plusieurs d'entre eux ont un mode d'action inconnu.

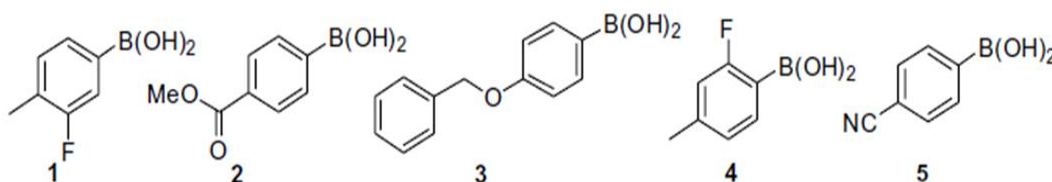
Tableau 7. Quelques inhibiteurs synthétiques de la détection d'AHLs.

| Composé QSI                                                           | Structure                                                                           | Bactéries testées          | Cible | Test                                               | Référence                        |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Composés synthétisés en se basant sur des inhibiteurs naturels</b> |                                                                                     |                            |       |                                                    |                                  |
| Betonicine                                                            |    | <i>A. tumefaciens</i> A136 | TraR  | Induction de la synthèse de $\beta$ -galactosidase | (Kim <i>et al.</i> , 2007)       |
| Floridoside                                                           |    | <i>A. tumefaciens</i> A136 | TraR  | Induction de la synthèse de $\beta$ -galactosidase | (Kim <i>et al.</i> , 2007)       |
| Acide isethionique                                                    |   | <i>A. tumefaciens</i> A136 | TraR  | Induction de la synthèse de $\beta$ -galactosidase | (Kim <i>et al.</i> , 2007)       |
| 3-hydroxycoumarin                                                     |  | <i>C. violaceum</i> CV026  | CviR  | Induction de la sécrétion de violacéine            | (D'Almeida <i>et al.</i> , 2017) |
|                                                                       |                                                                                     | <i>P. aeruginosa</i>       | LasR  | Formation du biofilm                               |                                  |
| 7-hydroxycoumarin                                                     |  | <i>C. violaceum</i> CV026  | CviR  | Induction de la sécrétion de violacéine            | (D'Almeida <i>et al.</i> , 2017) |

|                                                                    |                                                                                                   |                            |      |                                         |                                  |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------|-----------------------------------------|----------------------------------|
|                                                                    |                                                                                                   | <i>P. aeruginosa</i>       | LasR | Formation du biofilm                    |                                  |
| 6,7-dihydroxycoumarin                                              |                  | <i>C. violaceum</i> CV026  | CviR | Induction de la sécrétion de violacéine | (D'Almeida <i>et al.</i> , 2017) |
|                                                                    |                                                                                                   | <i>P. aeruginosa</i>       | LasR | Formation du biofilm                    |                                  |
| <b>Composés synthétisés en se basant sur les structures d'AHLs</b> |                                                                                                   |                            |      |                                         |                                  |
| 3-oxo-C12-(2-aminophénole)                                         |                  | <i>P. aeruginosa</i> PAO1  | LasR | Formation du biofilm                    | (Smith <i>et al.</i> , 2003)     |
| Bromophényle-HSL                                                   |                  | <i>A. tumefaciens</i> A136 | TraR | Production de $\beta$ -galactosidase    | (Geske <i>et al.</i> , 2005)     |
|                                                                    |                                                                                                   | <i>P. aeruginosa</i> PAO1  | LasR | Formation du biofilm                    |                                  |
| Indole-HSL                                                         |                 | <i>A. tumefaciens</i> A136 | TraR | Production de $\beta$ -galactosidase    | (Geske <i>et al.</i> , 2005)     |
|                                                                    |                                                                                                   | <i>P. aeruginosa</i> PAO1  | LasR | Formation du biofilm                    |                                  |
| N-(heptylsulfanylacetyl)-1-HSL                                     | <br>R = heptyl | <i>V. fischeri</i>         | LuxR | Bioluminescence                         | (Persson <i>et al.</i> , 2005)   |

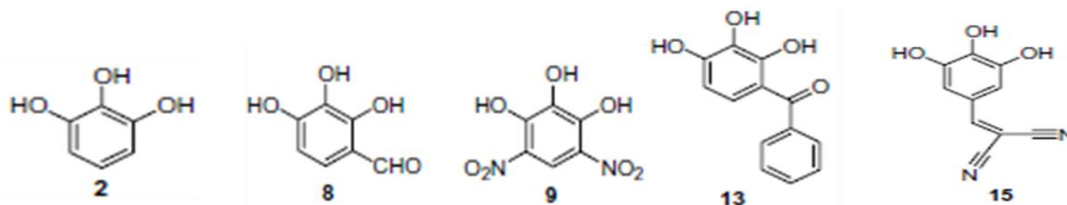
### 4.3.2. Inhibition de la détection d'AI2

Les études concernant l'inhibition de la détection d'AI2 sont limitées à quelques cas seulement. Les composés les plus connus identifiés comme des inhibiteurs de la voie AI2 sont le furanone et ses dérivés synthétisés naturellement par l'algue marine *Delisa pulchra*. Defoirdt *et al* ont montré que ces composés peuvent inhiber la luminescence ainsi que la virulence d'une souche de *V. harveyi* mutée au niveau de son système AHL et CAI-1 de QS, *V. harveyi* JMH597 (Defoirdt *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs acides gras trouvés naturellement dans les huiles végétales ont été identifiés comme des inhibiteurs de la voie de communication AI2 mais leur mode d'action reste inconnu. C'est le cas de l'acide linoléique, l'acide stéarique, l'acide oléique et l'acide palmitique. Ces acides gras inhibent la bioluminescence de la souche biosenseur *V. harveyi* BB170 (*luxN::Tn5 Kan*) suite à l'addition d'AI2 exogène (Widmer *et al.*, 2007). Récemment, la synthèse d'analogues d'AI2 a été effectuée par Ni *et al* en 2008, qui ont synthétisé et testé 50 dérivés d'acide boroniques et 15 dérivés de pyrogallol sur l'induction de la luminescence chez la souche *V. harveyi* MM32 (*luxN::Cm, luxS::Tn5 Kan*) (Ni, Chou, *et al.*, 2008; Ni, Choudhary, *et al.*, 2008). Dix analogues d'AI2 ont démontré leur efficacité dans ces deux études sur l'inhibition de l'induction de la bioluminescence avec une concentration inhibitrice médiane (IC50) plus petite que 10  $\mu$ M. Les structures de ces composés avec leurs noms sont présentées dans les figures 46 et 47 (la numérotation de référence est conservée sous chaque composé).



**Figure 46.** Analogues d'AI2 à base d'acide phényle-boronique (Ni, Chou, *et al.*, 2008).

(1) acide 4-méthyle-phényle-boronique, (2) acide 4-méthoxycarbonyl-phényle-boronique, (3) acide 4-benzyloxy-phényle-boronique, (4) acide 2-fluoro-4-méthyle-phényle-boronique, (5) acide 4-cyano-phényle-boronic



**Figure 47.** Analogues d'AI2 à base de pyrogallol (Ni, Choudhary, *et al.*, 2008).

(2) pyrogallol, (8) 4-formyl pyrogallol, (9) 4,6-dinitro pyrogallol, (13) phényl-méthanone pyrogallol, (15) éthylidène malonitrile pyrogallol.

## 5. Contexte du travail de thèse

### 5.1. Contexte et choix du modèle d'étude

Ce travail de thèse s'intègre dans les thématiques du laboratoire MAPIEM plus précisément au sein des thématiques de l'équipe « Aspects moléculaires de l'inhibition des biofilms marins » dirigée par Maëlle Molmeret. Cette équipe est composée de microbiologistes (Claudine Baraquet et Maëlle Molmeret) et de chimistes organiciens (Annie Praud, Yves Blache et Olivier Bottzeck) qui travaillent de concert afin d'étudier différents aspects de l'inhibition du biofilm en essayant de comprendre certains mécanismes impliqués dans la formation du biofilm et en synthétisant des analogues de synthèse qui viendraient cibler certains de ces mécanismes. L'objectif à plus longtermes serait de constituer des cocktails de molécules qui pourraient être intégrés dans des revêtements de peintures antifouling de type SPC (Self Polishing Coating) à relargage contrôlé de molécules plus respectueuses de l'environnement ou dans des revêtements hybrides de type SPC-FRC (Foul Release Coating) par ailleurs déjà efficaces sur le macrofouling lorsque le bâtiment est en mouvement mais inefficaces sur le microfouling (composés principalement de bactéries et de diatomées).

L'un des mécanismes étudiés au laboratoire MAPIEM est celui du QS des bactéries marines sur lequel une étude préliminaire avait débuté en 2011 avec la thèse de Mireille Ayé. Ce travail visait à identifier le lien entre la sécrétion de la violacéine chez une souche isolée de biofilms récoltés dans la rade de Toulon, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, le QS et la formation du biofilm (Ayé *et al.*, 2015). C'est en travaillant sur ce sujet que nous avons réalisé qu'excepté quelques souches de *Vibrio*, peu de biosenseurs fonctionnaient en conditions marines. Or l'un de nos objectifs était de pouvoir tester sur des bactéries marines formatrices de biofilm, le rôle potentiellement inhibiteur de molécules commerciales ou synthétisées au laboratoire MAPIEM ciblant le mécanisme de QS sur la formation du biofilm en conditions proches de l'environnement marin. De plus, il est possible que les bactéries marines présentent des caractéristiques différentes des autres bactéries en matière de QS. Par exemple, il a été montré que les bactéries marines tendent à sécréter des molécules d'AHLs différentes (notamment à chaînes très longues) par rapport à ce qui a déjà été rapporté chez d'autres bactéries (Doberva *et al.*, 2017). L'objectif ici était donc de trouver une autre bactérie marine susceptible d'avoir un QS actif et dont le phénotype serait facile à analyser et à quantifier. Travaillant déjà au laboratoire sur des bactéries du genre *Shewanella*, nous avons

identifié comme candidate potentielle, une bactérie luminescente *Shewanella woodyi* MS32 (ATCC 51908).

## 5.2. *Shewanella woodyi*

Les informations concernant cette bactérie sont limitées à quelques études seulement. *S. woodyi* est une bactérie Gram-, isolée en 1997 à partir d'échantillons d'eau prélevés à une profondeur de 200 à 300 m dans la mer d'Alboran (Makemson *et al.*, 1997). Makemson *et al* ont rapporté que c'est une bactérie aérobie, non sporulante, poussant à une température située entre 4 et 25°C et possédant un flagelle polaire. Elle peut utiliser l'oxygène, le nitrate ou le nitrite comme un accepteur terminal d'électron (Makemson *et al.*, 1997). Le génome de *S. woodyi* a été séquencé complètement par Copeland *et al* en 2008 (Copeland *et al.*, 2008). Liu *et al* ont montré en 2012 le rôle de c-di-GMP dans la régulation de la formation du biofilm chez cette bactérie (Niu Liu *et al.*, 2012). L'intérêt principal de ce modèle marin pour l'étude dont il est question ici, est lié au fait qu'elle émet de la luminescence et qu'elle soit capable de former un biofilm. Alors que les bactéries luminescentes sont probablement très abondantes dans l'environnement marin, seuls quelques genres ont été décrits avec des informations sur les mécanismes moléculaires de l'émission de luminescence. Parmi les quelques espèces bactériennes décrites comme capables d'émettre de la luminescence (appartenant aux genres *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* et *Vibrio*), seules quelques espèces de *Vibrio* telles que *V. fisheri*, *V. harveyi*, et dans une moindre mesure *V. campbellii* ont été décrites de façon détaillée (Bassler *et al.*, 1994; Eglund and Greenberg, 1999; Defoirdt *et al.*, 2008).

## 5.3. Le genre *Shewanella*

La première bactérie appartenant au genre de *Shewanella* a été isolée en 1931 comme un des plusieurs microorganismes contaminants responsables de la putréfaction du beurre. Derby et Hammer ont provisoirement identifié cette bactérie comme *Achromobacter putrefaciens* (Derby and Hammer, 1931). Après 54 ans et suite à des caractérisations biochimiques, métaboliques et en se basant sur la séquence d'ARNr 5S la bactérie découverte en 1931 a été classées sous un nouveau genre bactérien, *Shewanella* et la bactérie a pris le nom de *S. putrefaciens* (MacDonell and Colwell, 1985) {plus de détails dans la revue de (Hau and Gralnick, 2007)}. En se basant principalement sur la séquence d'ARNr 16S, 40 espèces appartenant au genre de *Shewanella* ont été identifiées comme par exemple, *S. algae* (ATCC 51192) (Nozue *et al.*, 1992), *S. baltica* (NCTC 10735) (Ziemke *et al.*, 1998), *S. frigidimarina* ATCC (700753) (Bowman *et al.*, 1997), *S. hanedai* (ATCC 33224) (Jensen *et al.*, 1980), *S.*



*oneidensis* (ATCC 700550) (Venkateswaran *et al.*, 1999), *S. violacea* (JCM 10179) (Nogi *et al.*, 1998) et *S. woodyi* MS32 (ATCC 51908) (Makemson *et al.*, 1997).

Généralement, les bactéries du genre *Shewanella* sont aérobies/anaérobies facultatives et largement distribuées dans l'eau douce et l'eau saline. Elles ont été isolées à partir d'une large gamme de température, de pression barométrique et de concentration en sel et elles sont caractérisées par leur capacité à utiliser différents accepteurs finaux d'électrons en absence d'oxygène tels que le nitrate, le nitrite, l'oxyde de triméthylamine (TMAO), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'oxyde de fer [fer(III)]. Ceci leur permet de vivre dans divers habitats et d'être impliquées dans des processus de bioremédiation et ainsi d'avoir un rôle important dans les cycle biogéochimiques (Hau and Gralnick, 2007). En plus de leur rôle dans la biorémediation, ces espèces peuvent occuper plusieurs fonctions dans l'environnement allant de la détérioration des aliments comme le cas de *S. baltica* responsable de la détérioration des poissons conservés dans la glace (Wang *et al.*, 2017), à la symbiose comme le cas de *S. henedai* qui colonise les glandes nidamentales accessoires, un organe dans le système reproducteur femelle du calmar (*Loligo pealei*) associé à la ponte des œufs (Barbieri *et al.*, 2001). De plus, certaines bactéries de ce genre sont pathogènes opportunistes pour l'être humain comme *S. algae* et *S. putrefaciens* qui peuvent être à l'origine de septicémie, de péritonite et d'infection de la peau et des voies biliaires (Nogi *et al.*, 1998; Hau and Gralnick, 2007).

#### 5.4. Le QS chez les bactéries du genre *Shewanella*

La plupart des études concernant les *Shewanella* traitent de leur implication dans les processus de bioremédiation (Heidelberg *et al.*, 2002; Gorby *et al.*, 2006; Marsili *et al.*, 2008). Bien que *S. henedai* soit décrite comme une bactérie luminescente dont les gènes *luxR*, *luxI* et l'opéron *lux* ont été séquencés, aucune étude concernant la caractérisation de son système QS n'a été réalisé à ce jour. Les études focalisées sur le QS chez ce genre bactérien sont limitées à quelques cas seulement. La première caractérisation de QS chez une espèce de *Shewanella* a été réalisée chez *S. oneidensis* par Learman *et al* en 2009 (Learman *et al.*, 2009). Dans cette étude, Learman *et al* ont montré que *S. oneidensis* ne synthétise aucune molécule d'AHL et ne possède pas un système AI2 actif. Elle serait capable de synthétiser l'AI2 via LuxS mais elle ne possède pas de récepteur pour cette molécule signal. De plus, la mutation de *luxS* chez *S. oneidensis* inhibe la formation du biofilm mais l'addition d'AI2 exogène ne restaure pas le phénotype normal. Ceci suggèrerait que LuxS serait impliqué dans le cycle de méthyle

(AMC) et la régénération de la méthionine plutôt que dans le QS comme cela a été vu chez d'autres bactéries (Learman *et al.*, 2009). À noter que le gène *luxS* semble être présent chez la plupart des bactéries appartenant au genre de *Shewanella* (Bodor *et al.*, 2008). Très récemment, des études chez les souches responsables de la détérioration des aliments comme *S. baltica* visaient à déterminer le rôle de QS dans ce processus. Il a été démontré que le développement de biofilms et la détérioration des *Pseudosciaena croceapossos* (une espèce des poissons marins) par *S. baltica* ne sont pas affectés par la présence d'AI2 exogène mais diminuent en présence des molécules d'AHLs comme la C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, C<sub>14</sub>-HSL, 3-O-C<sub>8</sub>-HSL, 3-O-C<sub>12</sub>-HSL et 3-O-C<sub>14</sub>-HSL. Ceci suggère un rôle régulateur des systèmes AHL de QS chez *S. baltica* (Zhu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Zhu *et al* ont montré que *S. baltica* ne synthétise aucune molécule d'AHLs et seulement 2 types d'auto-inducteurs ont été détectés dans son surnageant, l'AI2 et un dipeptide cyclique (Zhu *et al.*, 2016). Cependant, grâce à l'utilisation d'une approche de détection beaucoup plus sensible (Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry, UHPLC-QqQ-MS/MS), Wang *et al* ont montré en 2017 que *S. baltica* synthétise en fait principalement la C<sub>10</sub>-HSL et 6 autres molécules d'AHLs dont la C<sub>8</sub>-HSL. L'effet de ces différentes molécules sur la formation du biofilm par *S. baltica* a été également déterminé et il semblerait que le système AHL jouerait le rôle d'un stimulateur du biofilm chez cette bactérie (Wang *et al.*, 2017). Cependant, le mécanisme d'action du QS n'a pas encore été élucidé chez cette bactérie, ni les protéines synthases ni les récepteurs de ces molécules d'AHLs ne sont connus, sachant que le génome de cette bactérie n'est pas séquencé à ce jour. L'ensemble de ces résultats montrent une certaine diversité dans les systèmes QS présents au sein des *Shewanella* et de leur implication potentielle dans le biofilm.

## 6. Objectifs et plan de la thèse

L'intérêt de travailler avec *Shewanella woodyi* dans le cadre de cette thèse peut se résumer de la façon suivante :

- *S. woodyi* est une bactérie marine luminescente ayant un génome complètement séquencé, ce qui facilite la recherche d'un putatif système QS régulateur de la luminescence
- Aucune étude n'a été publiée à ce jour concernant une caractérisation de QS chez une bactérie luminescente appartenant au genre *Shewanella*, l'essentiel des études publiées

étant concentrées sur le genre *Vibrio* tels que *V. fischeri* ou *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004; Antunes *et al.*, 2007).

Le premier objectif était donc de vérifier que la luminescence, comme chez la plupart des bactéries est bien sous le control du QS. Le deuxième objectif est d'étudier le lien, s'il existe, entre QS et formation du biofilm chez cette bactérie. Plus précisément, ce travail a consisté en la caractérisation des systèmes AHL et AI2 chez *S. woodyi* et d'éventuellement rechercher des molécules inhibitrices de la formation du biofilm par interférence avec l'un ou les 2 systèmes.

Dans ce manuscrit, suite au **chapitre 1** représentant l'état de la bibliographie sur le sujet et **le chapitre 2** présentant les différentes méthodologies utilisées dans cette thèse, **les chapitres 3 et 4** regroupent les résultats obtenus au cours de ma thèse. La caractérisation générale de *S. woodyi* ainsi que de son système AHL et son implication dans la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm chez cette bactérie sera détaillée dans **le chapitre 3** sous forme d'un article et de résultats complémentaires et supplémentaires à l'article. Pour cette étude, une collaboration avec Raphaël Lami (laboratoire ARAGO à Banyuls/mer) a été mise en place et a consisté à utiliser les ressources de la plateforme du laboratoire de biodiversité et biotechnologies microbienne dans le cadre d'un projet EMBRC. La caractérisation du système AI2 ainsi que la recherche des molécules QSI pouvant inhiber la formation du biofilm chez *S. woodyi* seront décrits dans **le chapitre 4**.

En conclusion, cette étude sert à établir une relation entre QS-luminescence-adhésion et formation du biofilm chez *S. woodyi* et elle met en lumière la possibilité d'exploitation de cette bactérie à plus long terme comme un biosenseur QS utilisable en milieu marin.

## 7. Références bibliographiques

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S., Al-Fori, M., Gunasekera, S.P., Sudesh, K., and Paul, V.J. (2013) Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**: 759–772.
- Ahlgren, N.A., Harwood, C.S., Schaefer, A.L., Giraud, E., and Greenberg, E.P. (2011) Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7183–7188.
- Ahmer, B.M.M. (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **52**: 933–945.
- Alfaro, J.F., Zhang, T., Wynn, D.P., Karschner, E.L., and Zhou, Z.S. (2004) Synthesis of LuxS inhibitors targeting bacterial cell-cell communication. *Org Lett* **6**: 3043–3046.
- Amaya, S., Pereira, J.A., Borkosky, S.A., Valdez, J.C., Bardón, A., and Arena, M.E. (2012) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sesquiterpene lactones. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **19**: 1173–1177.
- Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3–6.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **67**: 575–585.
- Antunes, L.C.M., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B.R., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G., and Greenberg, E.P. (2007) Transcriptome Analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI Regulon. *J Bacteriol* **189**: 8387–8391.
- Asfour, H.Z. (2017) Antiquorum sensing natural compounds. *J Microsc Ultrastruct* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213879X16300797>.
- Atkinson, S., Throup, J.P., Stewart, G.S., and Williams, P. (1999) A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* **33**: 1267–1277.
- Atkinson, S., and Williams, P. (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* **6**: 959–978.
- Aye, A.M. (2015) Evidence of an AHL-based communication system quorum sensing in marine bacteria isolated from the Mediterranean Sea. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01233256>.
- Ayé, M.A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortaño-Magné, A., Culioli, G., Koffi Nevry, R., *et al.* (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology* **161**: 2039–2051.

- Bagert, J.D., Kessel, J.C. van, Sweredoski, M.J., Feng, L., Hess, S., Bassler, B.L., and Tirrell, D.A. (2016) Time-resolved proteomic analysis of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Chem Sci* <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SC03340C>. Accessed February 17, 2016.
- Balestrino, D., Haagenen, J.A.J., Rich, C., and Forestier, C. (2005) Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J Bacteriol* **187**: 2870–2880.
- Barbieri, E., Paster, B.J., Hughes, D., Zurek, L., Moser, D.P., Teske, A., and Sogin, M.L. (2001) Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda:Loliginidae). *Environ Microbiol* **3**: 151–167.
- Bassler, B.L. (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* **109**: 421–424.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043–4045.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* **9**: 773–786.
- Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**: 273–286.
- Beisel, C.L., and Storz, G. (2010) Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 866–882.
- Bellezza, I., Peirce, M.J., and Minelli, A. (2014) Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends Mol Med* **20**: 551–558.
- Berger, M., Neumann, A., Schulz, S., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2011) Tropodithietic acid production in *Phaeobacter gallaeciensis* is regulated by N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *J Bacteriol* **193**: 6576–6585.
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., *et al.* (2011) A Novel Metagenomic Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **6** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202535/>.
- Bijtenhoorn, P., Schipper, C., Hornung, C., Quitschau, M., Grond, S., Weiland, N., and Streit, W.R. (2011) BpiB05, a novel metagenome-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. *J Biotechnol* **155**: 86–94.
- Bobadilla Fazzini, R.A., Skindersoe, M.E., Bielecki, P., Puchałka, J., Givskov, M., and Martins dos Santos, V.A.P. (2013) Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response. *Environ Microbiol* **15**: 111–120.
- Bodini, S.F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., and Santori, F. (2009) Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Lett Appl Microbiol* **49**: 551–555.

- Bodor, A., Elxnat, B., Thiel, V., Schulz, S., and Wagner-Döbler, I. (2008) Potential for luxS related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC Microbiol* **8**: 13.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., and Bakri, Y. (2017) Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pac J Trop Med* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517302055>.
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Nichols, D.S., Skerratt, J.H., Rea, S.M., Nichols, P.D., and McMeekin, T.A. (1997) *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1040–1047.
- Boyd, A., and Chakrabarty, A.M. (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2355–2359.
- Brachmann, A.O., Brameyer, S., Kresovic, D., Hitkova, I., Kopp, Y., Manske, C., *et al.* (2013) Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat Chem Biol* **9**: 573–578.
- Brameyer, S., and Heermann, R. (2015) Specificity of Signal-Binding via Non-AHL LuxR-Type Receptors. *PLoS ONE* **10** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4414361/>. Accessed April 5, 2018.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11621–11626.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20–26.
- Camilli, A., and Bassler, B.L. (2006) Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* **311**: 1113–1116.
- Carlier, 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. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4989–4993.
- 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 MPMI* **11**: 1119–1129.
- Chai, Y., and Winans, S.C. (2004) Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol Microbiol* **51**: 765–776.
- Challan Belval, S., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., and Guzzo, J. (2006) Assessment of the Roles of LuxS, S-Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in Cell Attachment during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2644–2650.
- Chambers, J.R., and Sauer, K. (2013) Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends Microbiol* **21**: 39–49.

- Chan, K.-G., Atkinson, S., Mathee, K., Sam, C.-K., Chhabra, S.R., Cámara, M., *et al.* (2011) Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol* **11**: 51.
- Chan, K.-G., Liu, Y.-C., and Chang, C.-Y. (2015) Inhibiting N-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching *Pseudomonas* quinolone quorum sensing to attenuate virulence. *Front Microbiol* **6** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609879/>.
- Chan, Y.Y., Bian, H.S., Tan, T.M.C., Mattmann, M.E., Geske, G.D., Igarashi, J., *et al.* (2007) Control of Quorum Sensing by a *Burkholderia pseudomallei* Multidrug Efflux Pump. *J Bacteriol* **189**: 4320–4324.
- Chao, L., Rakshe, S., Leff, M., and Spormann, A.M. (2013) PdeB, a Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterase That Regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 Motility and Biofilm Formation. *J Bacteriol* **195**: 3827–3833.
- Chbib, C. (2017) Synthesis of isomeric analogues of S-ribosylhomocysteine analogues with homocysteine unit attached to C2 of ribose. *Bioorg Med Chem Lett* **27**: 1681–1685.
- Chen, C.-N., Chen, C.-J., Liao, C.-T., and Lee, C.-Y. (2009) A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiol* **9**: 89.
- Choi, H., Mascuch, S.J., Villa, F.A., Byrum, T., Teasdale, M.E., Smith, J.E., *et al.* (2012) Honaucins A–C, Potent Inhibitors of Eukaryotic Inflammation and Bacterial Quorum Sensing: Synthetic Derivatives and Structure-Activity Relationships. *Chem Biol* **19**: 589–598.
- Chou, S.-H., and Galperin, M.Y. (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J Bacteriol* **198**: 32–46.
- Chowdhary, P.K., Keshavan, N., Nguyen, H.Q., Peterson, J.A., González, J.E., and Haines, D.C. (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry (Mosc)* **46**: 14429–14437.
- Chu, Y.-Y., Nega, M., Wölfle, M., Plener, L., Grond, S., Jung, K., and Götz, F. (2013) A New Class of Quorum Quenching Molecules from *Staphylococcus* Species Affects Communication and Growth of Gram-Negative Bacteria. *PLoS Pathog* **9** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3784491/>.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3587–3590.
- Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., *et al.* (2011) Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12089–12094.
- Clark, B.R., Engene, N., Teasdale, M.E., Rowley, D.C., Matainaho, T., Valeriote, F.A., and Gerwick, W.H. (2008) Natural Products Chemistry and Taxonomy of the Marine Cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. *J Nat Prod* **71**: 1530–1537.

- Cole, S.P., Harwood, J., Lee, R., She, R., and Guiney, D.G. (2004) Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **186**: 3124–3132.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., and Glavina, D.R.T. (2008) Complete sequence of *Shewanella woodyi* ATCC 51908 Submitted (FEB-2008) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. .
- Cornell, K.A., Swarts, W.E., Barry, R.D., and Riscoe, M.K. (1996) Characterization of Recombinant *Escherichia coli* 5'-Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase: Analysis of Enzymatic Activity and Substrate Specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 724–732.
- Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**: 17–23.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., and Götz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427–5433.
- Cude, W.N., and Buchan, A. (2013) Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in the *Roseobacter* clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. *Front Microbiol* **4** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824088/>.
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y.-H., and Ellen, R.P. (2003) Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest* **112**: 1626–1632.
- D’Almeida, R.E., Molina, R.D.I., Viola, C.M., Luciardi, M.C., Nieto Peñalver, C., Bardón, A., and Arena, M.E. (2017) Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Bioorganic Chem* **73**: 37–42.
- Davey, M.E., and O’toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev MMR* **64**: 847–867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295–298.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., and Iglewski, B.H. (2001) Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1865–1873.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., and Verstraete, W. (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**: 69–88.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2005) The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environ Microbiol* **7**: 1239–1247.
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2006) Quorum Sensing-Disrupting Brominated Furanones Protect the Gnotobiotic Brine Shrimp



- Artemia franciscana from Pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6419–6423.
- Defoirdt, T., Verstraete, W., and Bossier, P. (2008) Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *J Appl Microbiol* **104**: 1480–1487.
- Deng, Y., Lim, A., Lee, J., Chen, S., An, S., Dong, Y.-H., and Zhang, L.-H. (2014) Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiol* **14**: 51.
- Derby, H.A., and Hammer, B.W. (1931) Bacteriology of butter IV. Bacteriological studies on surface taint butter. *Res Bull Iowa Agric Home Econ Exp Stn* **11** <https://lib.dr.iastate.edu/researchbulletin/vol11/iss145/1>.
- Devarajan, A., Bourquard, N., Grijalva, V.R., Gao, F., Ganapathy, E., Verma, J., and Reddy, S.T. (2013) Role of PON2 in innate immune response in an acute infection model. *Mol Genet Metab* **110**: 362–370.
- Dickschat, J.S. (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* **27**: 343.
- Diggie, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., and West, S.A. (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**: 411–414.
- Doberva, M. (2016) Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01377951/document>. Accessed April 5, 2018.
- Doberva, M., Stien, D., Sorres, J., Hue, N., Sanchez-Ferandin, S., Eparvier, V., et al. (2017) Large Diversity and Original Structures of Acyl-Homoserine Lactones in Strain MOLA 401, a Marine Rhodobacteraceae Bacterium. *Front Microbiol* **8** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01152/full>. Accessed February 28, 2018.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Alagely, A., Gunasekera, S.P., and Paul, V.J. (2010) Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ Microbiol Rep* **2**: 739–744.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., and Paul, V.J. (2011) Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**: 893–905.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., and Paul, V. (2009) Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**: 413–427.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1754–1759.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3526–3531.

- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881–890.
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X., and Tang, J.-L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10995–11000.
- 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. *J Lipid Res* **46**: 1239–1247.
- Duan, F., and March, J.C. (2010) Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11260–11264.
- Dubern, J.-F., and Diggle, S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882–888.
- 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 (Mosc)* **20**: 2444–2449.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol Microbiol* **31**: 1197–1204.
- Faruque, S.M., Biswas, K., Udden, S.M.N., Ahmad, Q.S., Sack, D.A., Nair, G.B., and Mekalanos, J.J. (2006) Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6350–6355.
- Federle, M.J., and Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**: 1291–1299.
- Ferluga, S., Bigirimana, J., Höfte, M., and Venturi, V. (2007) A LuxR homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for optimal rice virulence. *Mol Plant Pathol* **8**: 529–538.
- 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*. *Mol Microbiol* **26**: 251–259.
- Fletcher, M.P., Diggle, S.P., Crusz, S.A., Chhabra, S.R., Cámara, M., and Williams, P. (2007) A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. *Environ Microbiol* **9**: 2683–2693.
- Fu, S.-F., Wei, J.-Y., Chen, H.-W., Liu, Y.-Y., Lu, H.-Y., and Chou, J.-Y. (2015) Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signal Behav* **10** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623019/>.
- Fuqua, C. (2006) The QscR Quorum-Sensing Regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an Orphan Claims Its Identity. *J Bacteriol* **188**: 3169–3171.
- Fuqua, C., and Greenberg, E.P. (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 685–695.

- Fuqua, W.C., and Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796–2806.
- Galloway, W.R., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., and Spring, D.R. (2010) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**: 28–67.
- Gan, H.M., Gan, H.Y., Ahmad, N.H., Aziz, N.A., Hudson, A.O., and Savka, M.A. (2015) Whole genome sequencing and analysis reveal insights into the genetic structure, diversity and evolutionary relatedness of luxI and luxR homologs in bacteria belonging to the Sphingomonadaceae family. *Front Cell Infect Microbiol* **4** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288048/>.
- Gardiner, M., Fernandes, N.D., Nowakowski, D., Raftery, M., Kjelleberg, S., Zhong, L., *et al.* (2015) VarR controls colonization and virulence in the marine macroalgal pathogen *Nautella italica* R11. *Front Microbiol* **6** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4602140/>.
- Geisinger, E., Chen, J., and Novick, R.P. (2012) Allele-Dependent Differences in Quorum-Sensing Dynamics Result in Variant Expression of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **194**: 2854–2864.
- Geske, G.D., O'Neill, J.C., and Blackwell, H.E. (2008) Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Soc Rev* **37**: 1432–1447.
- Geske, G.D., Wezeman, R.J., Siegel, A.P., and Blackwell, H.E. (2005) Small Molecule Inhibitors of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation. *J Am Chem Soc* **127**: 12762–12763.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., *et al.* (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 11358–11363.
- Gottelt, M., Hesketh, A., Bunet, R., Puri, P., and Takano, E. (2012) Characterisation of a natural variant of the  $\gamma$ -butyrolactone signalling receptor. *BMC Res Notes* **5**: 379.
- Gould, T.A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R.C., and Churchill, M.E.A. (2006) Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Synthases Examined by Mass Spectrometry. *J Bacteriol* **188**: 773–783.
- Gray, B., Hall, P., and Gresham, H. (2013) Targeting agr- and agr-Like Quorum Sensing Systems for Development of Common Therapeutics to Treat Multiple Gram-Positive Bacterial Infections. *Sensors* **13**: 5130–5166.
- Guendouze, A., Plener, laure, Bzdrenga, J., Jacquet, P., Remy, B., Elias, M., *et al.* (2017) Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Front Microbiol* **8**: 10p.
- Gutierrez, J.A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M.-C., Almo, S.C., and Schramm, V.L. (2009) Transition state analogues of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nat Chem Biol* **5**: 251–257.

- Gutiérrez-Barranquero, J.A., Reen, F.J., McCarthy, R.R., and O’Gara, F. (2015) Deciphering the role of coumarin as a novel quorum sensing inhibitor suppressing virulence phenotypes in bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 3303–3316.
- Ha, D.-G., and O’Toole, G.A. (2015) c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiol Spectr* **3** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498269/>.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 228–233.
- Hammer, B.K., and Bassler, B.L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**: 101–104.
- 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. *J Bacteriol* **181**: 5766–5770.
- Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Parsek, M.R., Crone, T.J., and Greenberg, E.P. (1997) Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**: 4882–4887.
- Haras, D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l’analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matér Tech* **93**: s.27-s.41.
- Hau, H.H., and Gralnick, J.A. (2007) Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* **61**: 237–258.
- Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., *et al.* (2002) Genome sequence of the dissimilatory metal ion–reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* **20**: 1118.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263–273.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902–6914.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., *et al.* (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol Read Engl* **148**: 87–102.
- Hinsa, S.M., and O’Toole, G.A. (2006) Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiol Read Engl* **152**: 1375–1383.
- Hirakawa, H., and Tomita, H. (2013) Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Front Microbiol* **4**: 114.
- Hmelo, L.R. (2017) Quorum Sensing in Marine Microbial Environments. *Annu Rev Mar Sci* **9**: 257–281.

- Hoang, T.T., and Schweizer, H.P. (1999) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI): a Target for the Antimicrobial Triclosan and Its Role in Acylated Homoserine Lactone Synthesis. *J Bacteriol* **181**: 5489–5497.
- Holmqvist, E., Reimegård, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Römling, U., and Wagner, E.G.H. (2010) Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *EMBO J* **29**: 1840–1850.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1190–1197.
- Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu, P., Shen, J., Shao, Z., and Liu, Z. (2012) QsdH, a Novel AHL Lactonase in the RND-Type Inner Membrane of Marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* Strain 1A01261. *PLOS ONE* **7**: e46587.
- Huang, Y.-L., Ki, J.-S., Lee, O.O., and Qian, P.-Y. (2009) Evidence for the dynamics of Acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J* **3**: 296–304.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., *et al.* (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol Read Engl* **147**: 2517–2528.
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., and Kato, J. (2007) Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-Acyl Cyclopentylamides. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3183–3188.
- Jabbari, S., King, J.R., and Williams, P. (2012) Cross-strain quorum sensing inhibition by *Staphylococcus aureus*. Part 2: A spatially inhomogeneous model. *Bull Math Biol* **74**: 1326–1353.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M.S., Gérard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., *et al.* (2000) Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth agr Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 6517–6522.
- Jensen, M.J., Tebo, B.M., Baumann, P., Mandel, M., and Nealson, K.H. (1980) Characterization of *Alteromonas hanedai* (sp. nov.), a nonfermentative luminous species of marine origin. *Curr Microbiol* **3**: 311–315.
- Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027–2030.
- Jung, S.A., Chapman, C.A., and Ng, W.-L. (2015) Quadruple Quorum-Sensing Inputs Control *Vibrio cholerae* Virulence and Maintain System Robustness. *PLoS Pathog* **11** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4398556/>.
- Kalia, V.C. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* **31**: 224–245.
- Kaplan (2010) Biofilm Dispersal. *J Dent Res* **89**: 205–218.

- Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210–1214.
- Ke, X., Miller, L.C., and Bassler, B.L. (2015) Determinants governing ligand specificity of the *Vibrio harveyi* LuxN quorum-sensing receptor. *Mol Microbiol* **95**: 127–142.
- Kelly, R.C., Bolitho, M.E., Higgins, D.A., Lu, W., Ng, W.-L., Jeffrey, P.D., *et al.* (2009) The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat Chem Biol* **5**: 891–895.
- Keshavan, N.D., Chowdhary, P.K., Haines, D.C., and González, J.E. (2005) l-Canavanine Made by *Medicago sativa* Interferes with Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**: 8427–8436.
- 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. *J Bacteriol* **191**: 1320–1329.
- Khan, S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S., and Farrand, S.K. (2005) Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting *phz* box. *J Bacteriol* **187**: 6517–6527.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2005) Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry (Mosc)* **44**: 6371–6382.
- Kim, J.S., Kim, Y.H., Seo, Y.W., and Park, S. (2007) Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnol Bioprocess Eng* **12**: 308.
- Kimbrough, J.H., and Stabb, E.V. (2013) Substrate Specificity and Function of the Pheromone Receptor AinR in *Vibrio fischeri* ES114. *J Bacteriol* **195**: 5223–5232.
- Kimbrough, J.H., and Stabb, E.V. (2017) Comparative analysis reveals regulatory motifs at the *ainS/ainR* pheromone-signaling locus of *Vibrio fischeri*. *Sci Rep* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601948/>. Accessed April 4, 2018.
- Kjelleberg, S., and Molin, S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* **5**: 254–258.
- Kolter, R., and Greenberg, E.P. (2006) Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**: 300–302.
- Kong, K.-F., Vuong, C., and Otto, M. (2006) *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**: 133–139.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G., and Samaj, J. (2015) Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv* **33**: 1024–1042.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5089–5099.

Kwan, J.C., Meickle, T., Ladwa, D., Teplitski, M., Paul, V., and Luesch, H. (2011) Lyngbyoic acid, a “tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biosyst* **7**: 1205–1216.

Kwan, J.C., Teplitski, M., Gunasekera, S.P., Paul, V.J., and Luesch, H. (2010) Isolation and Biological Evaluation of 8-epi-Malyngamide C from the Floridian Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Nat Prod* **73**: 463–466.

Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**: 692–698.

Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. (2014a) Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *Int J Biol Sci* **10**: 550–565.

Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. (2014b) N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing with Special Reference to Use of Quorum Quenching Bacteria in Membrane Biofouling Control. *BioMed Res Int* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/162584/>. Accessed September 15, 2017.

LaSarre, B., and Federle, M.J. (2013) Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 73–111.

Lawrence, J.R., Scharf, B., Packroff, G., and Neu, T.R. (2002) Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microb Ecol* **44**: 199–207.

Leadbetter, J.R., and Greenberg, E.P. (2000) Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**: 6921–6926.

Learman, D.R., Yi, H., Brown, S.D., Martin, S.L., Geesey, G.G., Stevens, A.M., and Hochella, M.F. (2009) Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in Biofilm Development and Sulfur Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1301–1307.

Lee, J., and Zhang, L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **6**: 26–41.

Lee, J.-H., and Lee, J. (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 426–444.

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. *J Bacteriol* **188**: 3365–3370.

Li, J., Lim, M.S., Li, S., Brock, M., Pique, M.E., Woods, V.L., and Craig, L. (2008) VIBRIO CHOLERAEE TOXIN-COREGULATED PILUS STRUCTURE ANALYZED BY HYDROGEN/DEUTERIUM EXCHANGE MASS SPECTROMETRY. *Struct Lond Engl* **1993** **16**: 137–148.

- Li, Z., and Nair, S.K. (2012) Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci* **21**: 1403–1417.
- Lin, Y.-H., Xu, J.-L., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., and Zhang, L.-H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**: 849–860.
- Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A.L., Mattmann, M.E., Christensen, Q.H., Kessler, A., *et al.* (2011) Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16765–16770.
- Lindsay, A., and Ahmer, B.M.M. (2005) Effect of *sdiA* on Biosensors of N-Acylhomoserine Lactones. *J Bacteriol* **187**: 5054–5058.
- Liu, H.B., Koh, K.P., Kim, J.S., Seo, Y., and Park, S. (2008) The effects of betonicine, floridoside, and isethionic acid from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* on quorum-sensing activity. *Biotechnol Bioprocess Eng* **13**: 458–463.
- Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Boon, E.M. (2012) Nitric Oxide Regulation of Cyclic di-GMP Synthesis and Hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry (Mosc)* **51**: 2087–2099.
- Liu, Z., Zhao, J., Liang, X., Li, K., Xiao, X., Zhu, J., *et al.* (2012) Characterization of luminescent *Vibrio campbellii* LZ5 and its potential application in the detection of environmental heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* **59**: 405–410.
- Llamas, I., Keshavan, N., and González, J.E. (2004) Use of *Sinorhizobium meliloti* as an Indicator for Specific Detection of Long-Chain N-Acyl Homoserine Lactones. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3715–3723.
- Loeb, G.I., and Neihof, R.A. (1975) Marine Conditioning Films. In *Applied Chemistry at Protein Interfaces*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 319–335 <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1975-0145.ch016>.
- Lowery, C.A., Matamouros, S., Niessen, S., Zhu, J., Scolnick, J., Lively, J.M., *et al.* (2013) A Chemical Biology Approach to Interrogate Quorum-Sensing Regulated Behaviors at the Molecular and Cellular Level. *Chem Biol* **20**: 903–911.
- Lupp, C., and Ruby, E.G. (2004) *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: Comparative Study of Two Signal Synthases. *J Bacteriol* **186**: 3873–3881.
- Lupp, C., and Ruby, E.G. (2005) *Vibrio fischeri* Uses Two Quorum-Sensing Systems for the Regulation of Early and Late Colonization Factors. *J Bacteriol* **187**: 3620–3629.
- Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E.P., and Ruby, E.G. (2003) The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol Microbiol* **50**: 319–331.
- MacDonell, M.T., and Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the Vibrionaceae, and Recommendation for Two New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* **6**: 171–182.



- Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K.-M., *et al.* (2000) Identification of Three Essential Regulatory Gene Loci Governing Expression of Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. *Infect Immun* **68**: 3799–3807.
- Makemson, J.C., Fulayfil, N.R., Landry, W., Van Ert, L.M., Wimpee, C.F., Widder, E.A., and Case, J.F. (1997) Shewanella woodyi sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**: 1034–1039.
- Malladi, V.L.A., Sobczak, A.J., Meyer, T.M., Pei, D., and Wnuk, S.F. (2011) Inhibition of LuxS by S-ribosylhomocysteine analogues containing a [4-aza]ribose ring. *Bioorg Med Chem* **19**: 5507–5519.
- Marketon, M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A., and González, J.E. (2003) Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in Sinorhizobium meliloti. *J Bacteriol* **185**: 325–331.
- Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008) Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 3968–3973.
- Massai, F., Imperi, F., Quattrucci, S., Zennaro, E., Visca, P., and Leoni, L. (2011) A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone quorum sensing signal. *Biosens Bioelectron* **26**: 3444–3449.
- 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.
- McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. (2008) Competitive and Cooperative Effects in Quorum-Sensing-Regulated Galactoglucan Biosynthesis in Sinorhizobium meliloti. *J Bacteriol* **190**: 5308–5317.
- McLean, R.J.C., Pierson, L.S., and Fuqua, C. (2004) A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods* **58**: 351–360.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4933–4942.
- Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H., and Shi, W. (2003) Mutation of luxS Affects Biofilm Formation in Streptococcus mutans. *Infect Immun* **71**: 1972–1979.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199.
- Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2004) Salmonella typhimurium Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol Cell* **15**: 677–687.
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, 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. *J Bacteriol* **183**: 3537–3547.

Montaser, R., Paul, V.J., and Luesch, H. (2013) Modular strategies for structure and function employed by marine cyanobacteria: characterization and synthesis of pitinoic acids. *Org Lett* **15**: 4050–4053.

Montgomery, M.T., and Kirchman, D.L. (1993) Role of Chitin-Binding Proteins in the Specific Attachment of the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* to Chitin. *Appl Environ Microbiol* **59**: 373–379.

Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., and Ikeda, T. (2008) Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 1887–1893.

Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C.D., Goldberg, J.B., and Bassler, B.L. (2017) The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLOS Pathog* **13**: e1006504.

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012) The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **76**: 46–65.

Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A.D., Vos, W.M. de, and Nagasawa, H. (2001) Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **41**: 145–154.

Nealson, and Hastings (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281490/>. Accessed August 3, 2017.

Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *J Bacteriol* **104**: 313–322.

Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., Lu, C.-D., Tai, P.C., and Wang, B. (2008) Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 590–594.

Ni, N., Choudhary, G., Li, M., and Wang, B. (2008) Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 1567–1572.

Nogi, Y., Kato, C., and Horikoshi, K. (1998) Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch Microbiol* **170**: 331–338.

Nozue, H., Hayashi, T., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Hamasaki, K., Ohwada, K., and Terawaki, Y. (1992) Isolation and characterization of *Shewanella* alga from human clinical specimens and emendation of the description of *S. alga* Simidu et al., 1990, 335. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 628–634.

- O'Neill, J.C., Lin, Q., Geske, G.D., and Blackwell, H.E. (2009) New and Unexpected Insights into the Modulation of LuxR-type Quorum Sensing by Cyclic Dipeptides. *ACS Chem Biol* **4**: 1051–1059.
- Ooka, K., Fukumoto, A., Yamanaka, T., Shimada, K., Ishihara, R., Anzai, Y., and Kato, F. (2013) Piericidins, Novel Quorum-Sensing Inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026, from *Streptomyces* sp. TOHO-Y209 and TOHO-O348. *Open J Med Chem* **2013** <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=40387>. Accessed September 20, 2017.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49–79.
- Ozer, E.A., Pezzulo, A., Shih, D.M., Chun, C., Furlong, C., Lysis, A.J., *et al.* (2005) Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 29–37.
- Packiavathy, I.A.S.V., Priya, S., Pandian, S.K., and Ravi, A.V. (2014) Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* **148**: 453–460.
- Papaioannou, E., Wahjudi, M., Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Setroikromo, R., and Quax, W.J. (2009) Quorum-Quenching Acylase Reduces the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4891–4897.
- Papenfort, K., and Bassler, B. (2016) Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**: 576–588.
- Paranjpye, R.N., and Strom, M.S. (2005) A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect Immun* **73**: 1411–1422.
- Parashar, A., Parashar, S., Zingade, A., Gupta, S., and Sanikop, S. (2015) Interspecies communication in oral biofilm: An ocean of information. *Oral Sci Int* **12**: 37–42.
- Park, D.-K., Lee, K.-E., Baek, C.-H., Kim, I.H., Kwon, J.-H., Lee, W.K., *et al.* (2006) Cyclo(Phe-Pro) Modulates the Expression of *ompU* in *Vibrio* spp. *J Bacteriol* **188**: 2214–2221.
- 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. *Appl Environ Microbiol* **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. *Microbiol Read Engl* **149**: 1541–1550.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 8789–8793.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27–33.

- Parsek, M.R., Schaefer, A.L., and Greenberg, E.P. (1997) Analysis of random and site-directed mutations in rhII, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol Microbiol* **26**: 301–310.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4360–4365.
- Parveen, N., and Cornell, K.A. (2011) Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol Microbiol* **79**: 7–20.
- Pasmore, M., and Costerton, J.W. (2003) Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**: 407–413.
- Patankar, A.V., and González, J.E. (2009) Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 739–756.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 197–201.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**: 5756–5767.
- 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. *J Bacteriol* **181**: 1203–1210.
- Peat, S.M., and Adams, B.J. (2008) Natural selection on the luxA gene of bioluminescent bacteria. *SYMBIOSIS-REHOVOT* **46**: 101.
- Pei, D., and Zhu, J. (2004) Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Curr Opin Chem Biol* **8**: 492–497.
- Pellock, B.J., Teplitski, M., Boinay, R.P., Bauer, W.D., and Walker, G.C. (2002) A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**: 5067–5076.
- Persson, T., Givskov, M., and Nielsen, J. (2005) Quorum sensing inhibition: targeting chemical communication in gram-negative bacteria. *Curr Med Chem* **12**: 3103–3115.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11229–11234.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**: 285–293.
- Prouty, A.M., Schwesinger, W.H., and Gunn, J.S. (2002) Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun* **70**: 2640–2649.

- Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S., and Schaefer, A.L. (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **179**: 7530–7537.
- Rai, N., Anand, R., Ramkumar, K., Sreenivasan, V., Dabholkar, S., Venkatesh, K.V., and Thattai, M. (2012) Prediction by promoter logic in bacterial quorum sensing. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002361.
- Rai, N., Rai, R., and Venkatesh, K.V. (2015) Quorum sensing biosensors. In *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. Springer, pp. 173–183 [http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-1982-8\\_16](http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-1982-8_16).
- Rajesh, P.S., and Rai, V.R. (2016) Inhibition of QS-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pectobacterium carotovorum* by AHL-lactonase of endophytic bacterium *Bacillus cereus* VT96. *Biocatal Agric Biotechnol* **7**: 154–163.
- Rajesh, P.S., and Ravishankar Rai, V. (2014) Quorum quenching activity in cell-free lysate of endophytic bacteria isolated from *Pterocarpus santalinus* Linn., and its effect on quorum sensing regulated biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol Res* **169**: 561–569.
- Rajput, A., Kaur, K., and Kumar, M. (2016) SigMol: repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **44**: D634–D639.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., and Gram, L. (2001) Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Methods* **44**: 239–251.
- Reichelt, J.L., and Baumann, P. (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Für Mikrobiol* **94**: 283–330.
- Rémy, B., Plener, L., Elias, M., Daudé, D., and Chabrière, E. (2016) Enzymes for disrupting bacterial communication, an alternative to antibiotics? *Ann Pharm Fr* **74**: 413–420.
- Rémy, B., Plener, L., Poirier, L., Elias, M., Daudé, D., and Chabrière, E. (2016) Harnessing hyperthermostable lactonase from *Sulfolobus solfataricus* for biotechnological applications. *Sci Rep* **6**: 37780.
- Rezzonico, F., Smits, T.H.M., and Duffy, B. (2012) Detection of AI-2 Receptors in Genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosystems. *Sensors* **12**: 6645–6665.
- 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.
- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Cámara, 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.
- Römling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **77**: 1–52.

- Roy, V., Adams, B.L., and Bentley, W.E. (2011) Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme Microb Technol* **49**: 113–123.
- Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C.-Y., and Bentley, W.E. (2010) Cross Species Quorum Quenching Using a Native AI-2 Processing Enzyme. *ACS Chem Biol* **5**: 223–232.
- Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., and Briand, J.-F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol* **15**: 2879–2893.
- Saurav, K., Costantino, V., Venturi, V., and Steindler, L. (2017) Quorum Sensing Inhibitors from the Sea Discovered Using Bacterial N-acyl-homoserine Lactone-Based Biosensors. *Mar Drugs* **15** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5367010/>.
- Savka, M.A., Le, P.T., and Burr, T.J. (2010) LasR Receptor for Detection of Long-Chain Quorum-Sensing Signals: Identification of N-Acyl-homoserine Lactones Encoded by the *avsl* Locus of *Agrobacterium vitis*. *Curr Microbiol* **62**: 101–110.
- 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**: 595–599.
- Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000) Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol* **305**: 288–301.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**: 463–476.
- 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.
- Scholz, R.L., and Greenberg, E.P. (2017) Positive Autoregulation of an Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Circuit Synchronizes the Population Response. *mBio* **8** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527315/>.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., and Hertel, W.M. (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**: 87–98.
- Seed, P.C., Passador, L., and Iglewski, B.H. (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* **177**: 654–659.
- Seidl, K., Chen, L., Bayer, A.S., Hady, W.A., Kreiswirth, B.N., and Xiong, Y.Q. (2011) Relationship of *agr* Expression and Function with Virulence and Vancomycin Treatment Outcomes in Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ▽. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 5631–5639.
- Shen, G., Rajan, R., Zhu, J., Bell, C.E., and Pei, D. (2006) Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteinase. *J Med Chem* **49**: 3003–3011.

- Shepherd, R.W., and Lindow, S.E. (2009) Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol* **75**: 45–53.
- Singh, V.K., Kavita, K., Prabhakaran, R., and Jha, B. (2013) Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling* **29**: 855–867.
- 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. *Infect Immun* **74**: 1673–1682.
- Skindersoe, M.E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Nys, R. de, and Givskov, M. (2008) Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar Biotechnol N Y* **10**: 56–63.
- Slattery, M., Rajbhandari, I., and Wesson, K. (2001) Competition-Mediated Antibiotic Induction in the Marine Bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microb Ecol* **41**: 90–96.
- Smith, K.M., Bu, Y., and Suga, H. (2003) Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol* **10**: 81–89.
- Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **18**: 96–104.
- Spoering, A.L., and Gilmore, M.S. (2006) Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* **9**: 133–137.
- Steindler, L., and Venturi, V. (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**: 1–9.
- Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J.C., and Fuqua, C. (1998) Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum-Sensing Signal Molecules In Situ and In Vitro. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3486–3490.
- Studer, S.V., Mandel, M.J., and Ruby, E.G. (2008) AinS Quorum Sensing Regulates the *Vibrio fischeri* Acetate Switch. *J Bacteriol* **190**: 5915–5923.
- Sturme, M.H.J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D.L., Vaughn, E.E., and Vos, W.M. de (2002) Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 233–243.
- Subramoni, S., Florez Salcedo, D.V., and Suarez-Moreno, Z.R. (2015) A bioinformatic survey of distribution, conservation, and probable functions of LuxR solo regulators in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **5**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4338825/>.
- Subramoni, S., Gonzalez, J.F., Johnson, A., Péchy-Tarr, M., Rochat, L., Paulsen, I., *et al.* (2011) Bacterial Subfamily of LuxR Regulators That Respond to Plant Compounds. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4579–4588.

- Subramoni, S., and Venturi, V. (2009) LuxR-family ‘solos’: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* **155**: 1377–1385.
- Suckow, G., Seitz, P., and Blokesch, M. (2011) Quorum Sensing Contributes to Natural Transformation of *Vibrio cholerae* in a Species-Specific Manner<sup>∇</sup>. *J Bacteriol* **193**: 4914–4924.
- Swem, L.R., Swem, D.L., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2008) Deducing receptor signaling parameters from in vivo analysis: LuxN/AI-1 quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Cell* **134**: 461–473.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., *et al.* (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* **179**: 5271–5281.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomás, J.M., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. (1999) Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **67**: 5192–5199.
- Taga, M.E., Miller, S.T., and Bassler, B.L. (2003) Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **50**: 1411–1427.
- Tan, L., Li, S.R., Jiang, B., Hu, X.M., and Li, S. (2018) Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. *Front Microbiol* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5789755/>. Accessed April 5, 2018.
- Tang, K., and Zhang, X.-H. (2014) Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar Drugs* **12**: 3245–3282.
- Tavender, T.J., Halliday, N.M., Hardie, K.R., and Winzer, K. (2008) LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. *BMC Microbiol* **8**: 98.
- Tavori, H., Khatib, S., Aviram, M., and Vaya, J. (2008) Characterization of the PON1 active site using modeling simulation, in relation to PON1 lactonase activity. *Bioorg Med Chem* **16**: 7504–7509.
- Teasdale, M.E., Donovan, K.A., Forschner-Dancause, S.R., and Rowley, D.C. (2011) Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. *Mar Biotechnol N Y N* **13**: 722–732.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., and Horswill, A.R. (2011) Peptide signaling in the *Staphylococci*. *Chem Rev* **111**: 117–151.
- Tischler, A.D., and Camilli, A. (2005) Cyclic Diguanylate Regulates *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression. *Infect Immun* **73**: 5873–5882.
- Ueda, A., and Wood, T.K. (2009) Connecting Quorum Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885). *PLOS Pathog* **5**: e1000483.



- Uroz, S., Chhabra, S.R., Cámara, 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. *Microbiol Read Engl* **151**: 3313–3322.
- Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., and Dessaux, Y. (2007) N-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain D1. *Arch Microbiol* **187**: 249–256.
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.-T., Faure, D., and Dessaux, Y. (2008) A *Rhodococcus* qsdA-Encoded Enzyme Defines a Novel Class of Large-Spectrum Quorum-Quenching Lactonases. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1357–1366.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Jansen, A., Quintana, A. I., and Michiels, C. w. (2004) Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. *J Appl Microbiol* **96**: 177–184.
- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 705–724.
- Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., and Ruby, E.G. (2000) *Vibrio fischeri* lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *J Bacteriol* **182**: 4578–4586.
- Visick, K.L., O’Shea, T.M., Klein, A.H., Geszvain, K., and Wolfe, A.J. (2007) The Sugar Phosphotransferase System of *Vibrio fischeri* Inhibits both Motility and Bioluminescence. *J Bacteriol* **189**: 2571–2574.
- 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. *J Bacteriol* **185**: 2080–2095.
- Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., Assen, A.H.G. van, Merkerk, R. van, Cool, R.H., *et al.* (2011) PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiol Read Engl* **157**: 2042–2055.
- Walters, M., and Sperandio, V. (2006) Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**: 5445–5455.
- 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*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2524–2530.
- Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Someya, N., and Ikeda, T. (2012) AidC, a Novel N-Acylhomoserine Lactonase from the Potato Root-Associated Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides (CFB) Group Bacterium *Chryseobacterium* sp. Strain StRB126. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7985–7992.

- Wang, Y., Zhang, W., Wu, Z., Zhu, X., and Lu, C. (2011) Functional analysis of luxS in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Vet Microbiol* **152**: 151–160.
- Wang, Y., Zhang, X., Wang, C., Fu, L., Yi, Y., and Zhang, Y. (2017) Identification and Quantification of Acylated Homoserine Lactones in *Shewanella baltica*, the Specific Spoilage Organism of *Pseudosciaena crocea*, by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **65**: 4804–4810.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and Bassler, B.L. (2008) Quorum Sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* through Modulation of Cyclic Di-GMP Levels and Repression of vpsT. *J Bacteriol* **190**: 2527–2536.
- Watnick, P., and Kolter, R. (2000) Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675–2679.
- Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., Bodman, S.B. von, and Churchill, M.E.A. (2002) Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Signal Production in Bacterial Quorum Sensing. *Mol Cell* **9**: 685–694.
- Weigel, W.A., and Demuth, D.R. (2016) QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in Enterobacteriaceae and Pasteurellaceae. *Mol Oral Microbiol* **31**: 379–397.
- Widmer, K.W., Soni, K.A., Hume, M.E., Beier, R.C., Jesudhasan, P., and Pillai, S.D. (2007) Identification of Poultry Meat-Derived Fatty Acids Functioning as Quorum Sensing Signal Inhibitors to Autoinducer-2 (AI-2). *J Food Sci* **72**: M363–M368.
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dyé, 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. *J Bacteriol* **184**: 4510–4519.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Cámara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1119–1134.
- Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., *et al.* (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9427–9431.
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jørgensen, F., Chhabra, S.R., *et al.* (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185–192.
- Wnuk, S.F., Robert, J., Sobczak, A.J., Meyers, B.P., Malladi, V.L.A., Zhu, J., *et al.* (2009) Inhibition of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) by substrate analogues modified at the ribosyl C-3 position. *Bioorg Med Chem* **17**: 6699–6706.

- Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z., and Markowska, K. (2016) Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet* **57**: 225–238.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**: 191–197.
- Xu, J., Zhou, L., Venturi, V., He, Y.-W., Kojima, M., Sakakibari, H., *et al.* (2015) Phytohormone-mediated interkingdom signaling shapes the outcome of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions. *BMC Plant Biol* **15** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307914/>. Accessed November 27, 2017.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., *et al.* (2006) Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **74**: 488–496.
- Yadav, M.K., Park, S.-W., Chae, S.-W., and Song, J.-J. (2014) Sinefungin, a Natural Nucleoside Analogue of S-Adenosylmethionine, Inhibits *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Growth. *BioMed Res Int* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/156987/>. Accessed September 13, 2017.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* **50**: 75–104.
- Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T., and Kuramitsu, H.K. (2005) LuxS-Based Signaling Affects *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2372–2380.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., and Zhou, S. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1137–1144.
- Zan, J., Cicirelli, E.M., Mohamed, N.M., Sibhatu, H., Kroll, S., Choi, O., *et al.* (2012) A Complex LuxR-LuxI Type Quorum Sensing Network in a Roseobacterial Marine Sponge Symbiont Activates Flagellar Motility and Inhibits Biofilm Formation. *Mol Microbiol* **85**: 916–933.
- Zhang, G., Zhang, F., Ding, G., Li, J., Guo, X., Zhu, J., *et al.* (2012) Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon. *ISME J* **6**: 1336–1344.
- 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*. *Mol Microbiol* **65**: 121–136.
- Zhang, S., Liu, N., Liang, W., Han, Q., Zhang, W., and Li, C. (2017) Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 3371–3378.
- Zhao, A., Zhu, J., Ye, X., Ge, Y., and Li, J. (2016) Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Food Microbiol* **230**: 73–80.

Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., and Gong, Q. (2013) Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnol Lett* **35**: 631–637.

Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the Autoinducer 3-Oxo-octanoyl-Homoserine Lactone Strongly Inhibit Activity of the TraR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 5398–5405.

Zhu, J., Zhao, A., Feng, L., and Gao, H. (2016) Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *Int J Food Microbiol* **217**: 146–155.

Zhu, S., Wu, H., Zeng, M., Liu, Z., and Wang, Y. (2015) The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*. *Int J Food Microbiol* **192**: 26–33.

Ziemke, F., Höfle, M.G., Lalucat, J., and Rosselló-Mora, R. (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**: 179–186.



# *Chapitre II*

## *Matériels et Méthodes*



## 1. Souches, plasmides et oligonucléotides

### 1.1. Souches

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont regroupées en deux tableaux. Le tableau 8 comprend les souches utilisées dans la construction des mutants ainsi que les souches test, tandis que le tableau 9 comprend les biosenseurs utilisés dans les essais d’AHL et d’AI2.

**Tableau 8.** Liste des bactéries utilisées dans ce travail.

| Souche                         | Caractéristiques                                              | Référence                          |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Shewanella woodyi</i>       |                                                               |                                    |
| MS32, ATCC 51908               | Sauvage                                                       | (Makemson <i>et al.</i> , 1997)    |
| MS32 $\Delta luxI$ (Swoo_2997) | Mutée au niveau de la synthase d’AHL                          | Ce travail                         |
| MS32 $\Delta luxR$ (Swoo_2998) | Mutée au niveau du récepteur d’AHL                            | Ce travail                         |
| <i>Escherichia coli</i>        |                                                               |                                    |
| JM109 pBSK                     | Utilisée pour l’extraction du pBSK                            | Souches<br>MAPIEM                  |
| UQ950 pSMV3                    | Utilisée pour l’extraction de pSMV3                           | (Sukovich <i>et al.</i> ,<br>2010) |
| DH5 $\alpha$                   | Souche rendue compétente pour la transformation des plasmides | NEB                                |
| WM3064 $\Delta dapA$           | Souche donneuse pour la conjugaison bipartite                 | (Liu <i>et al.</i> ,<br>2012)      |

Les biosenseurs utilisées dans ce travail sont essentiellement des souches de *Chromobacterium violaceum*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Vibrio harveyi* (Tableau 9).

**Tableau 9.** Liste des biosenseurs utilisés dans ce travail.

| Biosenseur                       | Caractéristiques | Antibiotiques | Référence |
|----------------------------------|------------------|---------------|-----------|
| <i>Chromobacterium violaceum</i> |                  |               |           |



|                                                                                                 |                                                                                  |                                                          |                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| CV31532                                                                                         | Sauvage<br>Produit la C <sub>6</sub> -HSL                                        | Pas d'antibiotiques                                      | (McClellan <i>et al.</i> , 1997)      |
| CV026 <i>cviI::Tn5</i>                                                                          | Biosenseur C <sub>6</sub> -HSL et AHLs à chaîne latérale courte (<8carbones)     | Pas d'antibiotiques                                      |                                       |
| <b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>                                                         |                                                                                  |                                                          |                                       |
| KYC6                                                                                            | Sauvage<br>produit la 3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL                                  | Pas d'antibiotiques                                      | (Zhu <i>et al.</i> , 1998)            |
| A136 pCF218<br>( <i>P<sub>tetR</sub>::traR</i> )<br>pCF372<br>( <i>P<sub>traI</sub>::lacZ</i> ) | Biosenseur d'AHLs à chaîne latérale longue (≥ 8carbones)                         | Spectinomycine (50 µg/ml) et<br>Tétracycline (4,5 µg/ml) |                                       |
| <b><i>Vibrio harveyi</i></b>                                                                    |                                                                                  |                                                          |                                       |
| BB120                                                                                           | Sauvage<br>produit la 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL et d'AI2                          | Pas d'antibiotiques                                      | (Bassler <i>et al.</i> , 1997)        |
| BB475<br>( <i>luxM::Tn5</i><br><i>luxP::Tn5</i> )                                               | Emet de la luminescence suite à la détection de 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL exogène | Kanamycine (100 µg/ml)                                   | (Bassler <i>et al.</i> , 1994)        |
| MM32 ( <i>luxN::Cm</i><br><i>luxS::Tn5</i> )                                                    | Emet de la luminescence suite à la détection d'AI2 exogène                       | Kanamycine (50 µg/ml) et<br>Chloramphénicol (10 µg/ml)   | (Ni, Choudhary, <i>et al.</i> , 2008) |

## 1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés dans ce travail sont cités dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Liste des plasmides utilisés dans ce travail.

| Plasmide                    | Caractéristiques | Référence |
|-----------------------------|------------------|-----------|
| <b>pBluescriptSK (pBSK)</b> |                  |           |

|                     |                                                                       |                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| pBSK                | Vecteur de clonage. Mobilisable dans <i>E.coli</i> . Amp <sup>r</sup> | (Murakawa <i>et al.</i> , 2002) |
| pBSK $\Delta luxR$  | Permet la délétion de <i>luxR</i>                                     | Ce travail                      |
| pBSK $\Delta luxI$  | Permet la délétion de <i>luxI</i>                                     | Ce travail                      |
| <b>pSMV3</b>        |                                                                       |                                 |
| pSMV3               | Vecteur de conjugaison. Kan <sup>r</sup> , <i>sacB</i>                | (Liu <i>et al.</i> , 2012)      |
| pSMV3 $\Delta luxR$ | Permet la délétion de <i>luxR</i>                                     | Ce travail                      |
| pSMV3 $\Delta luxI$ | Permet la délétion de <i>luxI</i>                                     | Ce travail                      |

### 1.3. Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans ce travail sont cités dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

| Nom                                                                                   | Séquences (5'-3')                  | Description                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Oligonucléotides utilisés dans la construction des mutants de <i>S. woodyi</i></b> |                                    |                                                                                       |
| <i>luxR</i> -EA                                                                       | GAAGGGCCCGATGTCAATGTAGTCGCCATCATG  | Amplification de la région en amont de <i>luxR</i>                                    |
| <i>luxR</i> -IA                                                                       | GAAGGATCCTGCAGAATAGAGCTCAGGCGATTG  |                                                                                       |
| <i>luxR</i> -EB                                                                       | GAAACTAGTGGCTGGTGTCACTACCATGTAGAC  | Amplification de la région en aval de <i>luxR</i>                                     |
| <i>luxR</i> -IB                                                                       | GAAGGATCCTCTCATCAGAAGATGAGGATGAGC  |                                                                                       |
| <i>luxI</i> -EA                                                                       | GAAGGGCCCAGTATCTCACTCTCCCTTCCGGTC  | Amplification de la région en amont de <i>luxI</i>                                    |
| <i>luxI</i> -IA                                                                       | GAAGGATCC TCTGTTGAGTCGTTGGATTGTGTG |                                                                                       |
| <i>luxI</i> -EB                                                                       | GAAACTAGTTGCAAGACTGGTACGAGATTGATG  | Amplification de la région en aval de <i>luxI</i>                                     |
| <i>luxI</i> -IB                                                                       | GAAGGATCCATCTTCAATCAACTACTGCCAGAC  |                                                                                       |
| M13F                                                                                  | GTAAAACGACGGCCAG                   | Amplification du site de clonage du pBSK et pSMV3                                     |
| M13R                                                                                  | CAGGAAACAGCTATGAC                  |                                                                                       |
| <i>luxR</i> -forward                                                                  | GCACAGTTAAAGCCATGGCGGTTC           | Utilisé avec <i>luxR</i> -EB pour la vérification de la 1 <sup>ère</sup> évènement de |

|                                                  |                          |                                                                                                              |
|--------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                  |                          | recombinaison                                                                                                |
| <i>luxI</i> -<br><i>forward</i>                  | CAATCGCCTGAGCTCTATTCTGCA | Utilisé avec <i>luxI</i> -EB<br>pour la vérification de la<br>1 <sup>ère</sup> évènement de<br>recombinaison |
| <b>Oligonucléotides utilisés dans le RT-qPCR</b> |                          |                                                                                                              |
| <i>luxR</i> -up                                  | AAGCGTTTCATTGCCTGTGC     | Suivi de l'expression de <i>luxR</i>                                                                         |
| <i>luxR</i> -down                                | GCTCTGCATCCTTCAGACGA     |                                                                                                              |
| <i>luxI</i> -up                                  | ACACCAGCCACTAGAGTCGT     | Suivi de l'expression de <i>luxI</i>                                                                         |
| <i>luxI</i> -down                                | TTTGGTGCCTTTTCGATGG      |                                                                                                              |
| <i>luxS</i> -up                                  | ACATCAGCCTCTTTTGGCGA     | Suivi de l'expression de <i>luxS</i>                                                                         |
| <i>luxS</i> -down                                | CGCAGGCTTTATGCGTAACC     |                                                                                                              |
| <i>luxC</i> -up                                  | GGCGATAAAACACACTCCGC     | Suivi de l'expression de <i>luxC</i>                                                                         |
| <i>luxC</i> -down                                | ACGCTTTGTGTGGAGAAGCA     |                                                                                                              |
| <i>luxD</i> -up                                  | GCCTATGATGTCGCCAACGA     | Suivi de l'expression de <i>luxD</i>                                                                         |
| <i>luxD</i> -down                                | TGGTTGAGTTGAAGGTGTCCC    |                                                                                                              |
| 16S-up                                           | AATACCGCATACGCCCTACG     | Suivi de l'expression de l'ADN 16S                                                                           |
| 16S-down                                         | CATGGCTGCATCAGGCTTTC     |                                                                                                              |

## 2. Culture bactérienne

Toutes les cultures bactériennes faites dans ce travail ont été réalisées en trois étapes :

1. Isolement de la bactérie sur un milieu gélosé à partir de son cryotube stocké à -80°C.
2. Pré-culture qui sera incubée pendant une nuit à partir d'un clone bien isolé de l'étape 1.
3. Culture initiée à partir de la pré-culture par ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,1.

### 2.1. Milieux de cultures et solutions

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés dans cette étude, dont plusieurs sont spécifiques pour la croissance des bactéries marines.

#### 2.1.1. Nine salt solution (NSS) et vaatamen nine salt solution (VNSS)

Le milieu VNSS est un milieu spécifique pour la culture des bactéries marines. Il est préparé au laboratoire par l'addition des matières organiques sur une solution de neuf sels (Eguchi *et al.*, 1996). Après l'ajout de tous les substances citées dans le tableau 12, le VNSS est chauffé pendant 15 à 25 minutes pour devenir limpide et son pH est ajusté à 7,6. Le VNSS agar (VNSSA) est obtenu par l'addition de 15 g/l d'agar sur le milieu liquide avant autoclavage.

**Tableau 12.** Composition chimique du milieu VNSS.

|     | Réactifs                             | Poids moléculaire (g/mol) | Masse (g/l) |
|-----|--------------------------------------|---------------------------|-------------|
| NSS | NaCl                                 | 58,442                    | 17,6        |
|     | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 142,042                   | 1,47        |
|     | NaHCO <sub>3</sub>                   | 84,007                    | 0,008       |
|     | KCl                                  | 74,551                    | 0,25        |
|     | KBr                                  | 119,002                   | 0,04        |
|     | MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O | 203,3                     | 1,87        |
|     | CaCl <sub>2</sub>                    | 110,984                   | 0,31        |
|     | SrCl <sub>2</sub>                    | 158,526                   | 0,01        |
|     | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 61,833                    | 0,01        |

|                     |                                     |         |      |
|---------------------|-------------------------------------|---------|------|
| Eléments organiques | Peptone                             |         | 1    |
|                     | Extrait de levure                   |         | 0,5  |
|                     | Glucose                             | 180,155 | 0,5  |
|                     | Amidon                              |         | 0,5  |
|                     | FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 278,014 | 0,01 |
|                     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | 141,958 | 0,01 |

### 2.1.2. Marine Broth (MB) et Marine Agar (MA)

Le MB est un milieu de culture aussi spécifique pour les bactéries marines (Tableau 13), il est acheté sous forme d'une poudre et préparé simplement au laboratoire par addition de 37,4 g de cette poudre dans 1 litre d'eau. Ce milieu n'est pas complètement soluble dans l'eau à température ambiante, pour cela il est chauffé jusqu'à l'ébullition d'une minute avant autoclavage pour bien homogénéiser la solution. Son pH après autoclavage est de 7,6.

Le MA est le milieu gélosé de MB, il se différencie de celui-ci par la concentration de MgCl<sub>2</sub> (8,8 g/l au lieu de 5,9 g/l) et par la présence de 1,5 % m/v d'agar. Comme le cas de MB, le MA est acheté sous forme de poudre et préparé par dissociation de 55,1g dans 1 litre d'eau distillé.

**Tableau 13.** Composition chimique de MB.

| Réactif                         | Masse (g/l) |
|---------------------------------|-------------|
| Peptone                         | 5           |
| Yeast extract                   | 1           |
| NaCl                            | 19,450      |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,24        |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 0,16        |
| KCl                             | 0,55        |
| KBr                             | 0,08        |
| MgCl <sub>2</sub>               | 5,9         |
| CaCl <sub>2</sub>               | 1,8         |

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| SrCl <sub>2</sub>                              | 0,034 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                 | 0,022 |
| C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> | 0,1   |
| NaF                                            | 0,002 |
| (NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>              | 0,002 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               | 0,008 |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>               | 0,004 |

### 2.1.3. Sea salt (SS) ou Artificiel sea water (ASW)

L'ASW comme son nom l'indique est une solution d'eau de mer artificielle qui est dépourvue d'une source de carbone organique (Eguchi *et al.*, 1996). L'ASW permet d'être dans des conditions proches de la colonne d'eau en environnement marin. L'ASW est préparé par ajout de 36 g de la poudre *sea salt* (SigmaAldrich, France) dans un litre d'eau distillée (Tableau 14). Il est utilisé dans cette étude pour tester l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi* MS32 dans des conditions similaires à celles de l'environnement marin.

**Tableau 14.** Composition chimique de *Sea Salt*.

| Réactif          | Masse (mg/l) |
|------------------|--------------|
| Cl               | 19290        |
| Na               | 10780        |
| SO <sub>4</sub>  | 2660         |
| Mg               | 1320         |
| K                | 420          |
| Ca               | 450          |
| HCO <sub>3</sub> | 200          |
| Sr               | 8,8          |
| Br               | 56           |
| B                | 5,6          |

|                 |      |
|-----------------|------|
| I               | 0,24 |
| Li              | 0,3  |
| Eléments traces | 0,5  |

#### 2.1.4. Luria Broth (LB)

Le LB est un milieu de culture riche utilisé généralement pour la croissance des bactéries non marines ou pathogènes. Dans ce projet, le LB a été utilisé pour cultiver les différentes souches d'*E. coli* et des bactéries biosenseurs terrestres. Le LB est préparé par ajout de 20 g de poudre LB (*ThermoFisher scientific*) (Tableau 15) dans un litre d'eau distillée. Le LB agar (LBA) est préparé à partir de LB par addition de 15 g/L d'agar avant autoclavage.

**Tableau 15.** Composition chimique de LB.

| Réactif           | Masse (g/l) |
|-------------------|-------------|
| NaCL              | 5           |
| Tryptone          | 10          |
| Extrait de levure | 5           |

#### 2.1.5. LB-MB et LB-MB agar

Le milieu LB-MB est un mélange de 2 milieux de cultures, LB et MB où respectivement 10 g et 14 g de ces 2 milieux sont ajoutés à un litre d'eau distillé. Le LB-MB agar est obtenu par addition de 15 g/l d'agar au mélange précédant avant autoclavage. Ce milieu a été utilisé dans ce projet pour réaliser les différentes conjugaisons entre *S. woodyi* et *E. coli* dont il permet une croissance normale de ces 2 souches.

#### 2.1.6. Tampon phosphate buffered saline (PBS)

Le PBS est un tampon phosphate salin qui sert de façon générale à rincer les cellules afin d'enlever les traces de milieu avant tout traitement. Dans cette étude, il a servi aux lavages des amibes et des bactéries après leur fixation sur lame et après leurs marquages par des fluorochromes au cours d'études d'interactions entre les amibes et les bactéries et au cours du marquage du biofilm de *S. woodyi*. Son pH est ajusté à 7,4 après la mise en solution des composants cités dans le tableau 16 dans un litre d'eau.

**Tableau 16.** Composition chimique du PBS.

| Réactif                          | Masse (g/L) |
|----------------------------------|-------------|
| NaCl                             | 8           |
| KCl                              | 0,2         |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24        |

## 2.2. Antibiotiques et réactifs

### 2.2.1. Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans cette étude sont cités dans le tableau 17. Ils ont été préparés à une concentration stock de 50 mg/ml ou 10 mg/ml dans de l'eau distillée stérile ou dans l'éthanol absolu selon les recommandations des fournisseurs. Ces antibiotiques ont été utilisés dans les cultures de bactéries contenant des plasmides afin de maintenir ces derniers ou dans la sélection des bactéries transformées par des plasmides dans les différentes étapes de la construction des souches mutantes de *S. woodyi*.

**Tableau 17.** Les antibiotiques utilisés dans cette étude.

| Antibiotique          | Solvant (concentration stock) |
|-----------------------|-------------------------------|
| Ampicilline (Amp)     | Eau (50 mg/ml)                |
| Kanamycine (Kan)      | Eau (50 mg/ml)                |
| Chloramphenicol (Cat) | Éthanol (50 mg/ml)            |
| Tétracycline (Tet)    | Éthanol (10 mg/ml)            |
| Spectinomycine (Spc)  | Eau (10 mg/ml)                |

### 2.2.2. Réactifs

#### 2.2.2.1. Acide diaminopimélique (DAP)

Le DAP est un précurseur de la lysine nécessaire pour la construction des parois cellulaires bactériennes. Il est nécessaire à la croissance de la souche *E. coli* WM3064  $\Delta dapA$  utilisée dans cette étude. Après la mise en solution de DAP (SigmaAldrich, France) dans l'eau



distillée à une concentration stock de 50 mg/ml, celle-ci a été filtrée (0,22 µm) et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

#### **2.2.2.2. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)**

Le X-gal (VWR, France) est le substrat chromogénique de l'enzyme β-galactosidase (produit par le gène *lacZ*) où il donne une coloration bleue lors de son clivage par cette enzyme. Dans cette étude, il a servi à l'évaluation de l'expression du gène *lacZ* pendant les expériences de transformations bactériennes (coloration blanc/bleu) et pendant les essais réalisés avec la bactérie biosenseur *A. tumefaciens* A136. Il a été préparé au laboratoire en le mélangeant à du diméthylformamide (DMF) (AcrosOrganics) à une concentration stock de 20 mg/ml. La solution stock a été filtrée (0,22µm) et stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

#### **2.2.2.3. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)**

L'IPTG (SigmaAldrich, France) est un composé analogue de l'allolactose, un métabolite du lactose qui active la transcription de l'opéron *lac*. Dans cette étude, il a été utilisé dans la sélection blanc/bleu faite lors des clonages pendant la construction des souches mutantes. Il a été préparé en le solubilisant dans de l'eau distillée à une concentration stock de 100 mM. La solution stock a été filtrée (0,22 µm) et stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

### **2.3. Culture de *S. woodyi* MS32**

*S. woodyi* MS32 a été cultivée à 20°C sous agitation (120 rpm) dans du VNSS ou dans du MB liquide selon les besoins. La croissance en milieu solide gélosé a été effectuée également sur de VNSSA ou MA dans une étuve à 20°C.

### **2.4. Culture d'*E. coli***

Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C sous agitation (250 rpm) dans du LB liquide supplémenté ou non par un antibiotique selon le cas. L'addition de 100 µg/ml de DAP a été réalisée dans le cas de WM3064. L'isolement sur boîte a été effectué également sur LB puis les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C.

### **2.5. Culture de *V. harveyi***

BB120 a été cultivée à 30°C sous agitation (170 rpm) dans du MB et son isolement sur boîte a été effectué sur le milieu MA dans une étuve à 30°C. BB475 a été cultivée dans les mêmes conditions avec l'ajout de 100 µg/ml de kanamycine et la souche MM32 a été cultivée

similairement mais avec l'addition de 50 µg/ml de kanamycine et 10 µg/ml de chloramphénicol.

## **2.6. Culture de *C. violaceum***

CV026 et CV31352 ont été cultivées sur des boîtes LBA à une température de 30°C et leurs cultures liquides ont été effectuées sous agitation (200 rpm) en LB à 30°C.

## **2.7. Culture d'*A. tumefaciens***

Les cultures d'A136 et KYC6 ont été effectuées de la même manière que *C. violaceum* avec l'ajout de la spectinomycine (50 µg/ml) et de la tétracycline (4,5 µg/ml) dans le cas d'A136.

## **2.8. Conservation des souches bactériennes**

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été conservées à -80 °C par cryogénéisation. Pour cela, 500 µl de suspension bactérienne en phase post exponentielle sont mélangés avec 500 µl de glycérol à 50% dans l'eau distillée et sont introduites dans des cryotubes stériles de 1,8 ml (*ThermoFisher scientific*) et conservées à -80°C.

### 3. Techniques de biologie moléculaire

#### 3.1. Mutation des gènes *luxR*, *luxI* et *luxS*

La construction des souches mutantes *luxR*, *luxI* et *luxS* à partir de *S. woodyi* MS32 sauvage a été réalisée en suivant les mêmes étapes citées dans la liste ci-dessous pour les 3 gènes. Pour cela, dans ce qui suit, la mutation *luxR* sera prise comme exemple. A noter que la construction de la mutante *luxS* a été arrêtée à l'étape 2 par contrainte de temps.

1. Sous clonage
2. Clonage
3. Intégration du plasmide dans le génome de *S. woodyi*
4. Sélection des souches mutantes

##### 3.1.1. Sous clonage

Cette étape sert à obtenir une souche d'*E. coli* transformée par un plasmide recombinant contenant les régions bordantes du gène à muter afin de faciliter l'étape de clonage. Dans ce travail, le plasmide utilisé était le pBSK. C'est un plasmide de petite taille (environ 3 kb) qui comprend une séquence de résistance à l'ampicilline et un site de clonage multiple situé dans le gène *lacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase (Figure 48).

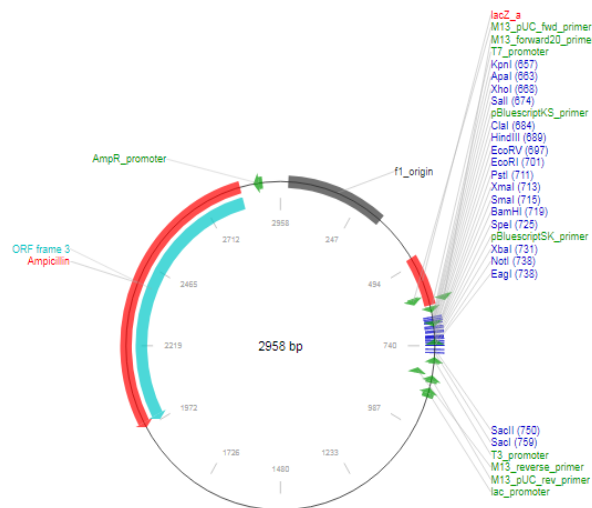
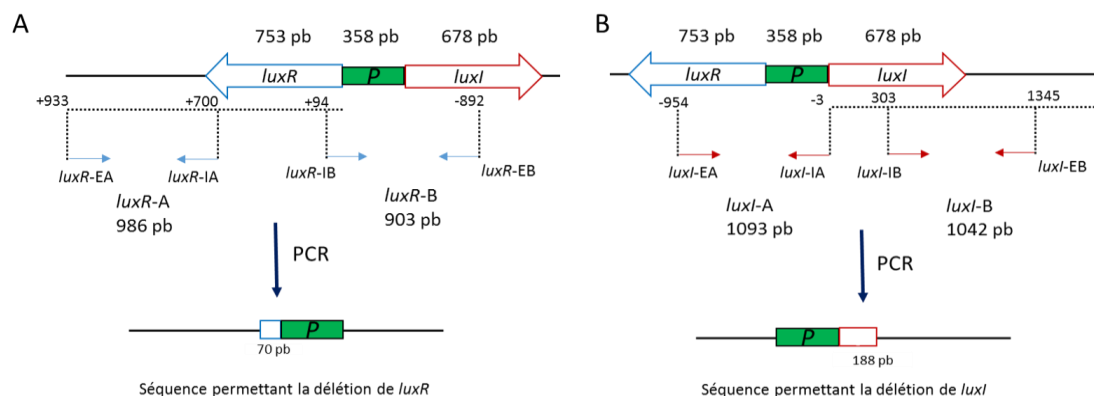


Figure 48. Carte génétique du plasmide pBSK.

##### 3.1.1.1. Construction de plasmide recombinant pBSK $\Delta$ *luxR*

Les régions bordantes du gène *luxR* (*luxR*-A et B) (Figure 49) ont été amplifiées par *polymerase chain reaction* (PCR) avec les couples des amorces *luxR*-EA, *luxR*-IA et *luxR*-EB, *luxR*-IB à partir de l'ADN génomique de la souche *S. woodyi* MS32 sauvage obtenu par

extraction à partir d'une pré-culture de *S. woodyi* dans MB en utilisant le *DNeasy Blood & Tissue Kits* (QIAGEN).



**Figure 49.** Représentation schématique de l'amplification des régions bordantes du gène *luxR* (A) et du gène *luxI* (B) à partir d'ADNg de *S. woodyi* par PCR.

*luxR-EA* et *luxR-IA* : Amorces permettant l'amplification de la région en amont de *luxR*. *luxR-EB* et *luxR-IB* : Amorces permettant l'amplification de la région en aval de *luxI*. Pareillement pour *luxI-EA*, *luxI-IA* et *luxI-EB*, *luxI-IB*. P représente la séquence promotrice entre située entre *luxR* et *luxI*.

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Sensoquest, Germanie) avec l'enzyme *HotStar HiFidelity* (QIAGEN) en utilisant le mélange réactionnel recommandé. Elle commence par une étape de dénaturation de l'ADN chromosomique à 95°C pendant 5 min, suivie de 25 cycles de synthèse et se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C. Chaque cycle de synthèse est constitué des 3 étapes :

1. Dénaturation de l'ADN double brin, 94°C pendant 15 secondes
2. Hybridation des amorces sur la matrice à  $T_m = 58^\circ\text{C}$
3. Elongation pour une durée d'une minute

Les produits PCR obtenus (*luxR-A* et B) ont été purifiés par un *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN) et digérés avec les enzymes de restriction *Apa1* et *BamH1* (NEB) dans le cas de *luxR-A* et avec *Spe1* et *BamH1* (NEB) dans le cas de *luxR-B*. La digestion enzymatique a été faite à 37°C selon les instructions de fournisseur (NEB).

Parallèlement, une extraction plasmidique et une digestion enzymatique de pBSK ont été réalisées. Un *QIAprep Spin Miniprep Kit* a été utilisé selon les instructions de fournisseur (QIAGEN) dans l'extraction de pBSK à partir d'une pré-culture de JM109 pBSK dans de LB supplémenté avec 10 µg/ml d'Amp. La digestion a été faite similairement à celle des inserts en utilisant *Apa1* et *Spe1* qui bordent les extrémités de ces derniers. Les inserts et les plasmides ainsi digérés sont purifiés et dosés.

Finalement, le plasmide recombinant pBSK  $\Delta luxR$  a été obtenu par une ligation qui permet d'insérer le *luxR-A* et B dans le pBSK digéré (extrémités cohésives générées par la

même enzyme de restriction). La *T4 DNA ligase* (NEB) a été utilisée selon les recommandations du fournisseur (NEB) à température ambiante pendant une heure.

### **3.1.1.2. Transformation et sélection des souches transformées**

Les cellules compétentes DH5 $\alpha$  ont été utilisées dans cette étape. Leurs transformations par le pBSK  $\Delta luxR$  ont été réalisées selon les instructions du fournisseur (NEB) avec quelques modifications. Le mélange « produit de ligation » a été ajouté sur DH5 $\alpha$  et l'ensemble (mélange ligation et cellules) a été incubé 30 min à 4°C. Les cellules ont été ainsi incubées pendant 2 heures à 37°C après un choc thermique réalisé en passant de 4°C à 42°C pendant 30 secondes.

La sélection des bactéries ayant intégré le plasmide pBSK  $\Delta luxR$  a été faite sur le milieu LBA supplémenté avec 25  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline, 40  $\mu\text{g/ml}$  de X-gal et 0.5 mM d'IPTG en se basant sur 2 paramètres : La coloration blanche/bleue et l'analyse PCR avec le couple d'amorces M13F et M13R. Puisque le site de clonage multiple de pBSK est situé dans le gène *lacZ*, lorsque celui-ci est interrompu par l'insert, la  $\beta$ -galactosidase n'est pas produite et ne peut donc cliver le substrat chromogénique X-Gal contenu dans le milieu. Les bactéries seront donc blanches. À l'inverse, si le gène *lacZ* n'est pas interrompu par un insert, il reste donc fonctionnel et est transcrit et traduit. La  $\beta$ -galactosidase produite pourra ainsi cliver le X-Gal et les bactéries deviendront alors bleues. Seules les bactéries blanches ont été analysées par PCR et les plasmides des souches présentant un profil contenant un fragment de 2 kb correspondant aux régions bordantes du gène *luxR* ont été vérifiés par séquençage (GATC Biotech, Allemagne).

À noter que toutes les PCR de vérification réalisées dans cette étude ont été effectuées avec 30 cycles grâce à l'enzyme *Go Tag DNA Polymerase* (Promega) en utilisant un mélange réactionnel identique à ce qui est recommandé par le fournisseur.

### **3.1.2. Clonage**

Cette étape sert à transférer la séquence clonée dans le Pbsk à un plasmide conjugatif et à transformer celui-ci dans une souche d'*E. coli* capable de réaliser la conjugaison. Pour ce faire, les régions bordantes de *luxR* ont été récupérées par digestion enzymatique de pBSK  $\Delta luxR$  (Apa1 et Spe1) et purifiées sur gel en utilisant le *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). En parallèle, une extraction, une digestion enzymatique (Apa1 et Spe1) et une purification de plasmide conjugatif pSMV3 ont été effectuées.

L'insert et le plasmide ainsi obtenus ont été ensuite ligués par *T4 DNA ligase* (NEB). Le plasmide recombinant résultant pSMV3  $\Delta luxR$  a été transformé dans les cellules compétentes WM3064 (cellules rendues compétentes en suivant le protocole de Green et Rogers (Green and Rogers, 2013)).

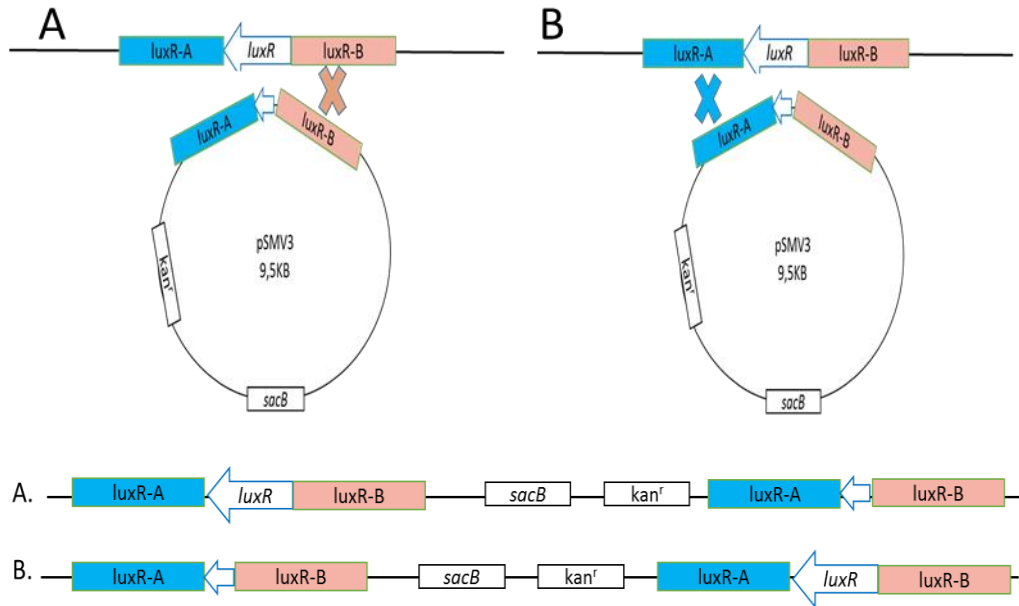
La sélection des souches WM3064 contenant le plasmide pSMV3  $\Delta luxR$  a été faite sur un milieu LBA supplémenté avec 25  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine, 40  $\mu\text{g/ml}$  de X-gal et 0.5 mM d'IPTG en suivant la même démarche décrite dans l'étape de sous clonage.

### 3.1.3. Intégration de plasmides dans le génome de *S. woodyi*

L'intégration du plasmide pSMV3  $\Delta luxR$  par un échange allélique dans le génome de *S. woodyi* a été effectuée par conjugaison bipartite réalisée avec la souche résultante de l'étape précédente WM3064 pSMV3  $\Delta luxR$  et la souche sauvage de *S. woodyi* MS32. Les deux souches ont été cultivées jusqu'à la phase post exponentielle de croissance puis mélangées avec un ratio de 3/1 v/v et déposées sans étalement sur une boîte de LB/MB agar supplémenté avec 100  $\mu\text{M}$  de DAP. Après 48 h d'incubation à 25°C, la culture a été reprise dans 1 ml de LB/MB et incubée pendant 2 h à 20°C sous agitation à 120 rpm afin de régénérer les cellules de *S. woodyi*. La sélection des clones de *S. woodyi* ayant intégré le pSMV3  $\Delta luxR$  a été effectuée sur des boîtes de LB/MB agar supplémenté avec 100  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine et 25  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline (l'ampicilline a été utilisé ici pour se débarrasser de toutes les souches de WM3064 pouvant éventuellement croître sans l'ajout de DAP sachant que *S. woodyi* est une souche ampicilline résistante même à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Les souches résistantes à la kanamycine ont été ensuite vérifiées par PCR en utilisant le couple d'amorces *luxR*-up et *luxR*-EB.

### 3.1.4. Sélection des souches mutantes

Deux configurations chromosomiques sont possibles suite à l'échange allélique issu du premier évènement de recombinaison entre *S. woodyi* MS32 et pSMV3  $\Delta luxR$  (Figure 50).



**Figure 50.** Configurations chromosomiques possibles après l'échange allélique avec le plasmide contenant les séquences bordantes du gène cible.

Le pSMV3 porte le gène *sacB* qui confère une sensibilité au sucrose. Pour cela, la sélection du deuxième évènement de recombinaison a été réalisée en ajoutant 5% de sucrose dans le milieu de culture. Les souches pouvant croître sur le saccharose doivent se débarrasser du plasmide portant le gène *sacB*, ce qui force alors le deuxième évènement de recombinaison en excisant la séquence plasmidique du génome. Pour cela, les souches ayant subi le premier évènement de recombinaison et vérifiées par PCR ont été striées à 20°C sur des boîtes de LB/MB agar supplémenté avec 5% de sucrose de façon à obtenir des clones isolés. Les clones qui ont apparu sur les boîtes contenant du sucrose sont ceux qui ont subi le deuxième évènement de recombinaison.

Théoriquement, deux possibilités pouvant avoir lieu après l'excision de plasmide : soit un retour au profil sauvage, soit l'obtention de la souche mutante. Afin de ne sélectionner que les souches mutantes, les clones résistants au sucrose obtenus ont été cultivés à 20°C en parallèle dans des boîtes contenant de LB/MB agar supplémenté avec :

1. De la kanamycine (100µg/ml) : Seuls les clones qui ont toujours le plasmide peuvent croître en présence de kanamycine. La kanamycine a été utilisée alors pour éliminer les clones faux positifs.
2. Du Sucrose à 5% : Seulement les souches qui ont excisé le plasmide peuvent s'croître en présence de sucrose. Les clones sucrose<sup>r</sup> ont alors été sélectionnés.

Les clones sensibles à la kanamycine et résistants au sucrose ont donc été sélectionnés. Le profil chromosomique de ces clones a été vérifié par PCR en utilisant *luxR*-up et *luxR*-EB et par séquençage (GATC Biotech, Allemagne).

### **3.2. Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)**

La RT-qPCR est une technique qui permet révéler l'expression d'un gène. C'est une technique qui met en jeu les étapes suivantes : l'extraction d'ARN, la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc), la PCR quantitative et l'analyse des résultats.

Dans ce travail, l'expression de 5 gènes a été quantifiée en conditions de cultures planctoniques et sessiles des souches de *S. woodyi* sauvage et mutantes dans le milieu VNSS. Il s'agit de *luxR* codant pour le récepteur d'AHL, *luxI* codant pour la synthase d'AHL, *luxS* codant pour la synthase AI2, *luxC* et *luxD* appartenant à l'opéron *lux* impliqué dans la synthèse et le fonctionnement de la luciférase. Les cellules de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  ont été collectées pendant le minimum et le maximum d'émission de la luminescence en conditions planctoniques et seulement pendant le maximum de luminescence en conditions sessiles.

#### **3.2.1. Extraction de l'ARN**

L'extraction de l'ARN a été fait en triplicat d'une façon identique pour tous les échantillons en utilisant le kit de Maxwell® (Promega : Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification kit) et l'instrument Maxwell® RSC selon les instructions de fournisseur. Pour préparer des cellules lysées, 15 ml des cultures bactériennes ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 15 min. Les culots ont été ensuite récupérés dans 1 ml de la solution d'homogénéisation supplémentée avec 0,02% de thioglycérol et lysés au *bead beater* en utilisant des billes de verre de 200 à 300  $\mu\text{m}$ . Les ARN obtenus ont été dosés et stockés à -80°C.

#### **3.2.2. Traitement à la DNase de l'ARN**

Pour éliminer toute trace d'ADN résiduel dans les échantillons d'ARN, un traitement à la DNase a été effectué selon le protocole de kit Ambion™ DNase I (*ThermoFisher scientific*) avec quelques modifications. Un mélange réactionnel contenant 10  $\mu\text{g}$  d'ARN, 5 ml de tampon et 1 ml de DNase dans un volume réactionnel de 10  $\mu\text{l}$  a été incubé à 37°C pendant une heure. Puis, 1  $\mu\text{l}$  de DNase a été ajouté et le tout a été à nouveau incubé à 37°C pendant 30 min. Ensuite, 5  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur de DNase ont été ajoutés ensuite et le mélange a été incubé



1 minute à température ambiante et centrifugé ensuite à 13000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant qui constitue l'ARN traité a été récupéré et conservé à 4°C.

Une vérification d'absence d'ADN génomique a été ensuite effectuée par PCR sur 1 µg d'ARN en utilisant un mélange de *Syber Green* (*ThermoFisher scientific: PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix*) dans un volume réactionnel de 10 µL. La PCR a été effectuée avec le couple d'amorces *luxR-up* et *luxR-down* (Tableau 11) dans une machine d'ABI 7500 (*Applied biosystem*). Un mélange réactionnel avec l'ajout de l'eau ou de l'ADN génomique (ADNg) à la place d'ARN a été pris comme un témoin négatif et positif respectivement.

### 3.2.3. Synthèse d'ADNc et réalisation de qPCR

La synthèse d'ADNc a été réalisée pour tous les échantillons en utilisant un *SuperScript™ IV VILO™ Master Mix* (Invitrogen) dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 1 µg d'ARN selon les instructions de fournisseur.

La qPCR qui permet la quantification de l'ADNc a été effectuée en triplicat avec les différents couples d'amorces cités dans le tableau 11 selon le protocole de kit *Syber Green* (*ThermoFisher scientific: PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix*) dans la machine ABI 7500 (*Applied biosystem*).

### 3.2.4. Courbe d'étalonnage et traitement des résultats

Afin de présenter les résultats obtenus sous forme de concentrations (en ng/µl), une courbe d'étalonnage a été établie pour chaque gène testé en amplifiant ce dernier avec le couple d'amorces approprié et en le mélangeant avec différentes concentrations d'ADNg allant de 2 ng/µl jusqu'à 0,0002 ng/µl. La droite d'étalonnage a été tracée sous forme des Ct (*threshold cycle*) obtenus en fonction du log d'ADNg. Un Ct est défini comme le cycle où la fluorescence obtenue est significativement supérieure au bruit de fond. Il faudra donc moins de cycles pour atteindre le Ct quand l'échantillon est plus concentré en molécules cibles (ADNg ou ADNc).

## 4. Techniques de microbiologie et de biologie cellulaire

### 4.1. Suivi de croissance et de luminescence de *S. woodyi*

#### 4.1.1. Cultures planctoniques

La culture planctonique des différentes souches de *S. woodyi* a été réalisée dans du VNSS à partir de pré-cultures après ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,1. La culture de 50 ml a été effectuée dans un erlenmeyer de 250 ml. L'erlenmeyer a été ensuite incubé sous agitation (120 rpm) à 20°C. L'absorbance à 600 nm a été mesurée manuellement au spectrophotomètre (*Thermo Scientific*, Genesys 20) et la mesure de la luminescence a été faite en triplicat au lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro) par addition de 200  $\mu$ l de culture bactérienne dans un puits d'une microplaque blanche à 96 puits (Greiner bio-one). La croissance et la luminescence de la souche sauvage de *S. woodyi* et les souches dérivées ( $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$ ) en conditions planctoniques ont été réalisées également dans 2 milieux de cultures différents, MB et ASW.

#### 4.1.2. Cultures sessiles

Les cultures sessiles ont été réalisées en parallèle dans des microplaques transparentes et blanches à 96 puits (Greiner bio-one) permettant respectivement la mesure de la  $DO_{600nm}$  et la luminescence. Les plaques ont étéensemencées par l'ajout de 200  $\mu$ l/puits de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance dans du VNSS après un ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,3. Les microplaques ont été ensuite incubées sous agitation (120 rpm) à 20°C dans des conditions humides. La mesure de la luminescence et de l'absorbance à 600 nm a été effectuée en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infini M 200 pro). Un triplicat biologique et expérimental ont été faits pour chaque bactérie et l'ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,3 a été décidé après un suivi de la luminescence et de la croissance de *S. woodyi* sauvage réalisé dans les mêmes conditions expérimentales en partant de quatre  $DO_{600nm}$  différentes (0,01, 0,1, 0,3 et 0,5).

Un suivi de la luminescence et de la croissance de *S. woodyi* sauvage a été effectué également dans les deux milieux de culture MB et ASW en partant de quatre  $DO_{600nm}$  différentes (0,01, 0,1, 0,3 et 0,5).

### 4.2. Tests de mobilité

Des tests pour deux types de mobilité ont été réalisés dans ce travail afin de vérifier l'effet des mutations sur la mobilité de *S. woodyi*. Il s'agit du *swimming* qui est dû à la

présence de flagelles permettant aux cellules de nager d'une façon individuelle dans un milieu liquide ou semi-liquide et du *swarming* qui consiste en un déplacement en petits groupes de bactéries d'une manière organisée grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles, à la surface d'une gélose.

#### **4.2.1. *Swimming***

Selon la définition, le *swimming* est un mode de nage des bactéries en milieu liquide ou semi-solide. Les essais de *swimming* ont été réalisés sur des boîtes de VNSS mou, préparées par ajout de 0,25% (m/v) d'agar (des essais ont été réalisés aussi par ajout de 0,3% d'agar) sur de VNSS liquide. Puis, 5  $\mu$ L d'une culture en VNSS de *S. woodyi* (sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$ ) en phase post exponentielle de croissance ont été ajoutés sous forme d'une goutte au centre des différentes boîtes. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C dans des conditions humides. La mobilité par *swimming* a été évaluée après 48h d'incubation par la mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles. Un triplicat expérimental et biologique a été fait pour chaque souche bactérienne. Des essais ont été également réalisés dans le milieu MB en utilisant 0,25% ou 0,3% (m/v) d'agar.

#### **4.2.2. *Swarming***

Les tests de mobilité par *swarming* ont été réalisés d'une façon semblable à celle du *swimming* avec une seule différence : les bactéries ont été ajoutées sur des boîtes VNSS ou MB contenant 0,5% (m/v) d'agar.

### **4.3. Tests d'adhésion et de la formation du biofilm**

Afin d'évaluer l'effet des mutations sur l'adhésion et la formation de biofilm par *S. woodyi*, des tests de comparaison d'adhésion et de formation de biofilm entre les différentes souches ont été réalisés dans des milieux de culture riches (VNSS et MB) ainsi qu'en ASW. La détermination d'adhésion et de la formation du biofilm a été faite respectivement par la mesure de la fluorescence émise suite à un marquage des bactéries par le Syto9 (*ThermoFisher scientific*) et par mesure de l'absorbance à 570 nm suite au marquage par du cristal violet (CV). Un triplicat biologique et expérimental ont été fait pour chaque bactérie selon les protocoles cités ci-dessous.

#### 4.3.1. Protocole du test d'adhésion

Le protocole utilisé pour réaliser le test d'adhésion a été adapté à partir de celui effectué dans la thèse de Mireille Ayé en 2015 (Aye, 2015). Les tests ont été réalisés dans des microplaques noires à 96 puits (Greiner bio-one) en ajoutant 200 µl/puits d'une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance après un ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,3. Les plaques ont été ensuite incubées à 20°C dans des conditions humides pendant 15 h. Après incubation, trois lavages (200 µl/puits) avec une solution de NaCl à 36 g/l ont été effectuées afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les bactéries résiduelles (adhérées) ont été ensuite marquées par ajout de 200 µl/puits de Syto9 dilué dans du NaCl à une concentration de 1 µM. Après 20 min d'incubation à l'obscurité, les puits ont été lavés trois fois avec du NaCl pour éliminer l'excès de Syto9 et la fluorescence a été mesurée ensuite en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infini M 200 pro) aux longueurs d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}= 475$  nm et d'émission  $\lambda_{em}=510$  nm. Les résultats de ces tests sont présentés sous la forme suivante : la moyenne des intensités de fluorescences (IF) obtenu à partir de triplicat bactérien soustrait puis divisé par la moyenne obtenue avec le milieu de culture stérile qui a été utilisé comme témoin. Les puits contenant du milieu de culture stérile ont été traités de la même manière que ceux contenant des bactéries afin de vérifier l'absence d'interaction entre le fluorochrome et le milieu de culture utilisé et d'éliminer le bruit de fond lié au marquage.

Les échantillons en ASW ont été préparés à partir de cultures en phase post exponentielle de croissance de *S. woodyi* en VNSS par une centrifugation pendant 10 min à 6000 rpm suivie par une dissociation du culot en ASW de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  de 0,3. La  $DO_{600nm}$  de 0,3 et le temps d'incubation de 15 h ont été choisis suite à un suivi d'adhésion réalisé uniquement en ASW pour *S. woodyi* sauvage à partir de différentes  $DO_{600nm}$  (0,1, 0,3 et 0,5). L'adhésion a été mesurée en suivant le même protocole cité ci-dessus après 3, 15 et 24 heures d'incubation.

#### 4.3.2. Mesure de formation de biofilm au cristal violet

Les tests de marquage au Cristal Violet (CV) de biofilms formés par *S. woodyi* sauvage et mutantes dans les milieux VNSS, MB et ASW ont été effectués selon le protocole de Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2012) avec quelques modifications. Les tests ont été réalisés dans des microplaques transparentes à 96 puits en ajoutant 100 µl/puits d'une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance en VNSS ou MB après un ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,5. Les plaques ont été ensuite incubées sans agitation à 20°C en conditions humides pendant

48 h. Après le temps d'incubation, trois lavages (100 µl/puits) avec de l'eau distillée ont été effectués afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les biofilms ont été ensuite marqués par ajout de 200 µl/puits de CV à 0,1% m/v dilué dans de l'eau distillée. Après 15 min d'incubation, les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée (200 µl/puits à chaque fois) pour éliminer l'excès de CV. Après 15 min de séchage à température ambiante le CV adsorbé a été solubilisé par l'addition de 100 µl de DMSO pur, suivi par une agitation à 120rpm et 20°C pendant 5 min. Les solutions contenant le DMSO et le CV solubilisé ont été ensuite transférées dans une autre microplaque transparente, puis l'absorbance à 570 nm a été mesurée dans chaque puits en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infit M 200 pro). Les résultats de ces tests sont présentés sous la forme suivante : moyenne des  $DO_{570nm}$  obtenues à partir de triplicats bactériens soustraite puis divisée par la moyenne obtenue avec le milieu de culture stérile qui a été utilisé comme témoin et traité de la même manière que les échantillons contenant les bactéries.

Les échantillons en ASW ont été préparés à partir des cultures en phase post exponentielle de croissance de *S. woodyi* en VNSS par une centrifugation pendant 10 min à 6000 rpm suivie par une suspension du culot en ASW de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  de 0,5. La  $DO_{600nm}$  de 0,5 et le temps d'incubation de 48 h ont été choisis suite à un suivi de la formation de biofilm de *S. woodyi* sauvage réalisé en VNSS et ASW en partant de différentes  $DO_{600nm}$  (0,01, 0,1, 0,3, 0,5 et 0,8). Le biofilm formé a été marqué au CV après 15, 24, 48 et 72 heures d'incubation.

#### **4.4. Imagerie de biofilms de *S. woodyi* par microscopie à balayage laser confocal (CLSM)**

L'imagerie du biofilm par CLSM a été utilisée comme une approche complémentaire permettant d'évaluer l'effet de mutation *luxR* ou *luxI* sur la formation du biofilm par *S. woodyi*. Elle permet d'obtenir des informations supplémentaires quant à la structure et l'épaisseur du biofilm.

Cette approche a été réalisée dans des microplaques à 24 puits contenant des lamelles circulaires en verre. Le marquage du biofilm formé par *S. woodyi* en VNSS, MB et ASW a été effectué en utilisant le marqueur Syto9 après 24, 48, 72 et 240 heures d'incubation à 20°C sans agitation. Dans le cas du VNSS et du MB, des cultures en phase post exponentielle de croissance de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  ont été diluées à une  $DO_{600nm}$  de 0,5 et ajoutées en triplicat aux microplaques (1 ml/puits). Dans le cas de l'ASW, les échantillons ont

été préparés à partir de cultures en phase post exponentielle de croissance de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  en VNSS par une centrifugation pendant 10 min à 6000 rpm suivie par une re-suspension du culot en ASW de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  de 0,5. Des puits contenant une culture de *S. woodyi*  $\Delta luxI$  dans les différents milieux avec l'addition de 50  $\mu M$  de C<sub>8</sub>-HSL ont été effectués afin d'évaluer le rôle de cette molécule dans la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

Après chaque temps d'incubation, les puits ont été lavés délicatement trois fois avec 1 ml du milieu stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sur les lamelles ont été fixées ensuite avec une solution de formaldéhyde à 3,7% pendant 30 min à température ambiante. Après trois lavages avec du PBS, un marquage goutte a été effectué. Des gouttes (80  $\mu l$ ) de Syto9 préparé dans du PBS ont été déposées sur du parafilm et les lamelles enlevées des puits sont retournées sur ces gouttes (de façon à avoir un contact entre les bactéries et la goutte de Syto9). Après 20 min d'incubation à température ambiante, trois lavages ont été effectués similairement avec une goutte de PBS pendant 5 min pour chaque lavage. Finalement, un montage entre lame et lamelle a été effectué en utilisant le ProLong® Diamond Antifade (*ThermoFisher scientific*) et les lames ont été mises à sécher à l'obscurité pendant 24 h à température ambiante. Pour chaque condition, trois champs différents de chaque lamelle ont été imagés à l'aide d'un logiciel connecté à un microscope à balayage laser confocal (*CLSM Zeiss LSM 510*).

#### 4.5. Co-culture d'amibes et de bactéries

Afin de tester l'effet des mutations *luxR* ou *luxI* sur l'interaction entre *S. woodyi* et l'amibe *Acanthamoeba castellanii*, des co-cultures ont été réalisées dans des microplaques à 24 puits contenant des lamelles circulaires en verre. Ces microplaques ont été incubées à 20°C sans agitation. Après 3, 24, 48 et 72 heures, un marquage des co-cultures a été effectué en utilisant le Syto9 à une concentration de 1,5  $\mu M$ . Des images de microscope à balayage laser confocal ont été prises ensuite avec le logiciel *CLSM Zeiss LSM 510* pour 5 champs différents de chaque lamelle. Cet essai a été fait en triplicat expérimental et biologique.

##### 4.5.1. Cultures amibiennes

Les amibes, *A. castellanii* ont été cultivées à 20°C dans du milieu PYG (protéose peptone 2%, yeast extract 0,1%, glucose 0,1 M, MgSO<sub>4</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,4 M, sodium citrate dihydrate 0,1%, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,05 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 2,5 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 2,5 mM) dans des flasques de culture cellulaire de 175 cm<sup>2</sup> (Matz *et al.*, 2008).

#### 4.5.2. Cultures bactériennes

Les cultures bactériennes de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  ont été effectuées dans du VNSS à 20°C et 120 rpm.

#### 4.5.3. Préparation des microplaques

Les différentes souches bactériennes ont été collectées pendant la phase post-exponentielle de croissance, centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min et redissout dans du NSS stérile. La  $DO_{600nm}$  a été ajustée à 1 qui correspond à  $10^9$  cellules/ml et des suspensions bactériennes ont été ensuite préparées dans de NSS de sorte à avoir  $5 \cdot 10^7$  cellules/ml.

Les microplaques contenant les lamelles microscopiques ont été stérilisées préalablement aux ultra-violet (UV) pendant 15 min. Puis, 1 ml de culture ambiante a été ajouté dans chaque puits à une concentration de  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml. Après 3 jours d'incubation à 20°C les amibes ont été récupérées à partir des flasques par grattage à l'aide de spatule souple (Sigma-Aldrich), centrifugées à 900 g pendant 15 min et re-suspendues dans du NSS stérile. Un comptage d'amibes a été effectué sur une cellule de Malassez en utilisant un microscope optique (Motic AE21) et une dilution a été faite dans du NSS pour atteindre une concentration de  $5 \cdot 10^5$  amibes/ml. Les plaques ont été ensuite incubées à 20°C pendant 16 h, temps nécessaire aux amibes pour adhérer sur les lamelles. Les puits ont été ensuite vidés par renversement des plaques et 1 ml de chaque suspension bactérienne préparée a été ajouté dans les puits. Des puits témoins ont été réalisés par ajout de 1 ml du NSS stérile. Les plaques ont été ensuite centrifugées à 900 g pendant 5 min et incubées à 20°C sans agitation. Un temps de contact de 3 h a été pris comme T0. Pour cela, après 3h d'incubation, les puits ont été lavés délicatement 3 fois avec de NSS stérile et les plaques ont été ensuite re-incubées à 20°C sans agitation.

#### 4.5.4. Protocole de marquage

L'évaluation des amibes infectées par les bactéries a été réalisée après 3 (T0), 27 (T24), 51 (T48) et 75 (T72) heures d'incubation. Après chaque temps d'incubation, les cellules adhérentes sur les lamelles ont été fixées et perméabilisées par une solution de méthanol/acétone (1/1 : v/v) pendant 20 min à 4°C. Les lamelles ont été lavées ensuite trois fois avec une solution de PBS et montées sur une goutte de Syto9 dilué dans du PBS à une concentration de  $1,5 \mu M$  et déposée sur une feuille de parafilm. Après 20 min d'incubation à température ambiante, 3 lavages ont été effectués avec une goutte de PBS pendant 5 min pour chaque lavage. Finalement, un montage entre lame et lamelle a été effectué en utilisant le

ProLong® Diamond Antifade (*ThermoFisher scientific*). Les lames ont été mises à sécher pendant 24 h à l'obscurité et à température ambiante.

#### 4.5.5. Microscopie confocale

Les images de microscopie confocale ont été prises avec le microscope à balayage laser confocal (*Zeiss LSM 510*) pour 5 champs différents de chaque lamelle. Les amibes totales et infectées ainsi que le nombre de phagosomes infectés par amibes ont été comptés dans chaque champ et les résultats sont présentés sous forme de la moyenne des valeurs obtenus dans chaque champ en suivant les formules suivantes :

- Pourcentage d'amibes infectées = le nombre d'amibes contenant une ou plusieurs bactéries, divisé par le nombre d'amibes total et multiplié par 100
- Pourcentage de phagosomes infectés = le nombre de phagosomes infectés compté divisé par le nombre d'amibes infectées et multiplié par 100

#### 4.6. Détection d' AHLs synthétisées par *S. woodyi*

La détection d' AHLs synthétisées par *S. woodyi* a été effectuée en utilisant trois types de bactéries biosenseurs, *V. harveyi* BB457, *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* A136 ([Tableau 9](#), page 135). Dans le cas de BB475, une approche d' induction de la luminescence a été réalisée en utilisant un surnageant d' une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance. L' ajout de milieu stérile ou surnageant de *V. harveyi* BB120 produisant la 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL à la souche BB475 ont servi respectivement de contrôle négatif et positif dans cette approche.

Dans le cas de CV026 et d' A136, plusieurs approches expérimentales ont été utilisées. Ces approches sont basées sur l' induction de la réponse contrôlée par les AHLs chez les bactéries biosenseurs cultivées sur des boites de milieu de culture gélosé. Ces réponses sont évaluées par l' observation de la coloration violette et bleue émise respectivement par CV026 et A136 lors de la détection d' AHLs. Les contrôles positifs et négatifs ont été réalisés dans les différentes approches en utilisant respectivement la bactérie biosenseur avec elle-même et la bactérie biosenseur avec une souche bactérienne appartenant à la même espèce synthétisant les AHLs reconnues par le biosenseur (CV31532 dans le cas de CV026 et KYC6 dans le cas de A136) ([Tableau 9](#), page 135).



#### **4.6.1. Détection d’AHLs de *S. woodyi* par BB475**

Cet essai a été réalisé uniquement avec *S. woodyi* sauvage et le protocole a été inspiré de ce réalisé par Surette et Bassler en 1998 (Surette and Bassler, 1998).

##### **4.6.1.1. Préparation des surnageants de *S. woodyi***

Les surnageants de *S. woodyi* utilisés dans cet essai ont été collectés pendant la phase post exponentielle de croissance au moment de l’émission maximale de la luminescence. Pour ce faire, des cultures de *S. woodyi* ont été préparées dans en MB et incubées sous agitation (120 rpm) à 20°C. Après 7 h d’incubation (il s’agit du temps où la luminescence émise est maximale selon la courbe de suivi de la luminescence en fonction du temps) des centrifugations à 6000 rpm pendant 10 min ont été effectuées. Les surnageants obtenus ont été filtrés ensuite (0,22 µm) et stockés à -20°C.

##### **4.6.1.2. Protocole d’induction de la luminescence de BB475**

Les cultures de *V. harveyi* BB475 ont été préparées en MB supplémenté avec 100 µg/ml de kanamycine et incubées sous agitation (170 rpm) à 30°C. Après une nuit d’incubation, une dilution au 1/5000<sup>ième</sup> a été effectuée dans du MB supplémenté avec 100 µg/ml de kanamycine et les cultures diluées ont été ajoutées dans des microplaques blanches à 96 puits. Puis, 10% v/v de surnageant de *S. woodyi* ont été ajoutés en triplicat dans les puits contenant la souche BB475 et les plaques ont été ensuite incubées dans des conditions humides sous agitation (170 rpm) à 30°C. Après 24 h d’incubation, la luminescence a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infit M 200 pro).

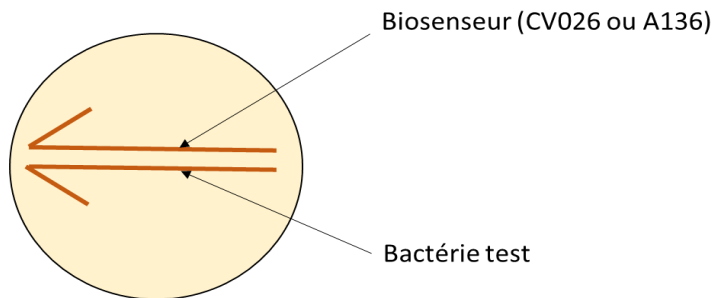
#### **4.6.2. Détection d’AHLs de *S. woodyi* par CV026 et A136**

Les différentes approches utilisées avec CV026 et A136 ont été effectuées selon les protocoles utilisés par Mireille Ayé pendant sa thèse (Aye, 2015). Les deux premières approches ont été effectuées avec les souches de *S. woodyi* sauvage, *S. woodyi*  $\Delta luxR$  et *S. woodyi*  $\Delta luxI$ , tandis que la troisième approche a été faite uniquement avec la souche de *S. woodyi* sauvage.

##### **4.6.2.1. 1<sup>ère</sup> approche : Stries en T sur boîte VNSS agar**

Le principe de cette approche est d’effectuer des stries en forme de T de la bactérie test et de la bactérie biosenseur sur une boîte de Pétri contenant un milieu de culture agar à une distance d’à peu près 5 mm (Figure 51). Si la bactérie test produit une AHL pouvant être

reconnue par le biosenseur, celle-ci pourra diffuser à travers la gélose et activer le QS du biosenseur.



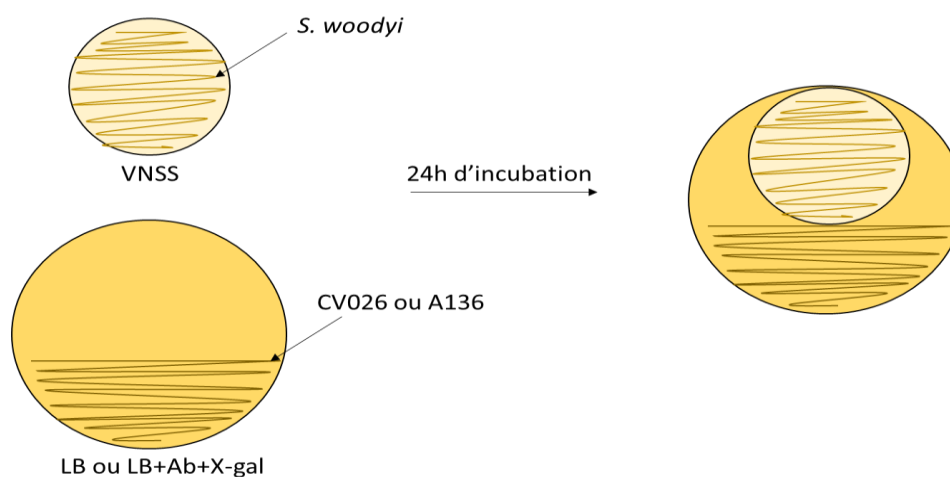
**Figure 51.** Technique de détection d'AHL par stries T croisées.

Pour ce faire, *S. woodyi*, CV026 et A136 ont été isolées dans un premier temps sur des boîtes de Pétri à partir de leur cryotube. Les milieux de cultures utilisés ont été respectivement, le VNSSA, le LBA et le LBA supplémentés avec 50 µg/ml de spectinomycine et 4,5 µg/ml de tetracycline. Après 72 h d'incubation à 20°C dans le cas de *S. woodyi* et à 30°C dans le cas de CV026 et A136, des stries en forme de T de *S. woodyi* et de CV026 ainsi que de *S. woodyi* et d'A136 ont été effectuées sur des boîtes de VNSSA supplémenté dans le cas d'A136 par 25 µg/ml de spectinomycine, 2 µg/ml de tetracycline, 40 µg/ml X-gal (la souche *S. woodyi* est résistante aux doses d'antibiotiques utilisés). Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C pendant 48 h. Si *S. woodyi* synthétise des AHLs qui peuvent activer le QS du biosenseur, un changement phénotypique visible du biosenseur doit s'effectuer. Il s'agit de la production de violacéine qui colore les colonies en violet dans le cas de CV026 et de la production de β-galactosidase (suite à l'expression du gène *lacZ*) qui clive le X-gal ajouté au milieu en colorant alors les colonies en bleu dans le cas d'A136.

#### **4.6.2.2. 2<sup>ème</sup> approche : cultures séparées de *S. woodyi* et des biosenseurs**

Cette approche est utilisée généralement quand la bactérie test et le biosenseur ne peuvent croître sur le même milieu de culture ou n'ont pas la même température optimale ou la même vitesse de croissance. Le principe est de faire pousser séparément la bactérie test et le biosenseur dans leurs conditions optimums de croissance (milieu et température) et de les mettre ensemble lorsqu'ils se sont correctement développés. Pour cela, dans ce travail les biosenseurs CV026 et A136 ont été cultivés à 30°C sur des boîtes de Pétri contenant de LBA supplémenté dans le cas d'A136 avec 50 µg/ml de spectinomycine et 4,5 µg/ml de tetracycline. Parallèlement, *S. woodyi* a été cultivée à 20°C sur des petites boîtes de Pétri (50 mm de diamètre) contenant du VNSSA. Après 24 h d'incubation, les petites boîtes ont été

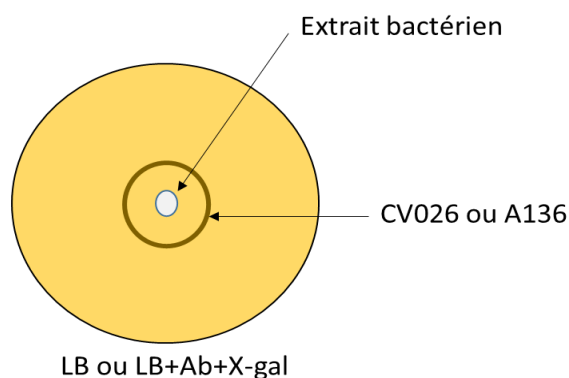
renversées sur les grandes boîtes de façon à avoir un contact direct entre VNSSA et LBA (Figure 52) afin de favoriser la diffusion d'éventuelles AHLs à travers les deux géloses. Les boîtes (l'une sur l'autre) ont été ensuite incubées à 20°C (température de croissance de *S. woodyi*) pendant 48 h. L'évaluation des résultats a été effectuée similairement à la première approche.



**Figure 52.** Technique de détection d'AHLs par contact de deux géloses différentes.

#### **4.6.2.3. Détection des AHLs à partir des extraits bactériens**

Cette approche est plus sensible que la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> approche puisqu'elle consiste à mettre en contact des extraits organiques à la place des bactéries vivantes avec le biosenseur. L'extrait de *S. woodyi* sauvage a été préparé selon le protocole cité dans la partie 4.11 (Page 166) et 10 µl de cet extrait ont été déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant de LBA ou de LBA supplémenté avec 50 µg/ml de spectinomycine, 4,5 µg/ml de tétracycline, et 40 µg/ml de X-gal. Après adsorption des extraits, les boîtes ont étéensemencées respectivement avec une culture de CV026 et d'A136 en phase post exponentielle de croissance de façon à avoir une forme circulaire autour de la goutte déposée au centre des boîtes (Figure 53). En suivant le même protocole d'extraction utilisé avec *S. woodyi*, des extraits de CV026 et d'A136 ont servi de contrôles négatifs ainsi que des extraits de CV31532 et de KYC6 ont servi de contrôles positifs dans cette approche.



**Figure 53.** Technique de détection d'AHLs par les biosenseurs à partir d'un extrait bactérien.

#### 4.7. Détection d'AI2 synthétisé par *S. woodyi*

La détection d'AI2 synthétisé par *S. woodyi* a été effectuée en utilisant le biosenseur d'AI2, *V. harveyi* MM32 ([Tableau 9](#), page 135). MM32 est une souche mutée au niveau des gènes codant pour le récepteur d'AHL (*luxM*) et la synthèse d'AI2 (*luxS*). MM32 est donc une souche non luminescente et elle émet de luminescence seulement suite en présence d'AI2 exogène. La démarche expérimentale utilisée avec MM32 est semblable à celle utilisée avec BB475 lors de la détection d'AHLs de *S. woodyi* ([partie 4.6.1](#), page 160). Brièvement, 10% v/v d'un surnageant de *S. woodyi* collectés à partir d'une culture en phase post exponentielle de croissance ont été ajoutés en triplicat dans des puits d'une microplaque blanche contenant une dilution au 1/5000<sup>ième</sup> d'une culture de MM32 incubée pendant une nuit à 30°C dans du MB supplémenté avec 50 µg/ml de kanamycine et 10 µg/ml de chloramphénicol. La luminescence a été mesurée après 24 h d'incubation sous agitation (170 rpm) à 30°C dans des conditions humides. Du milieu stérile MB et de surnageant de BB120 (contenant d'AI2) ont été utilisés comme de contrôle négatif et positif respectivement.

#### 4.8. Effet des AHLs exogènes sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm de *S. woodyi*

Les AHLs utilisées dans cette étude sont citées dans le tableau 18. L'effet de ces AHLs sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm de *S. woodyi* ont été testées en utilisant la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta luxI$ . Les AHLs ont été préparées à une concentration stock de 10 mM dans du milieu de culture stérile (VNSS, MB ou ASW) supplémenté avec 10% v/v de DMSO et stockées à -20°C.

**Tableau 18.** Molécules d’AHLs utilisées dans cette étude.

| Nom                                                     | Abbréviation              | Masse molaire (g/mol) |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| N-hexanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone                | C <sub>6</sub> -HSL       | 199,25                |
| N-octanoyl- <i>DL</i> -homosérine lactone               | C <sub>8</sub> -HSL       | 227,30                |
| N-decanoyl- <i>L</i> -homosérine lactone                | C <sub>10</sub> -HSL      | 255,35                |
| N-dodecanoyl- <i>DL</i> -homosérine lactone             | C <sub>12</sub> -HSL      | 283,41                |
| N-tetradecanoyl- <i>DL</i> -homosérine lactone          | C <sub>14</sub> -HSL      | 311,46                |
| 3-hydroxybutyryl]- <i>L</i> -homosérine lactone         | 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL  | 187,19                |
| (3-hydroxyoctanoyl)- <i>DL</i> -homosérine lactone      | 3-OH-C <sub>8</sub> -HSL  | 243,3                 |
| (3-hydroxydecanoyl)- <i>DL</i> -homosérine lactone      | 3-OH-C <sub>10</sub> -HSL | 271,35                |
| (3-hydroxydodecanoyl)- <i>DL</i> -homosérine lactone    | 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL | 299,41                |
| (3-hydroxytetradecanoyl)- <i>DL</i> -homosérine lactone | 3-OH-C <sub>14</sub> -HSL | 327,46                |
| (β-ketocaproyl)- <i>L</i> -homosérine lactone           | 3-O-C <sub>6</sub> -HSL   | 213,23                |
| (3-oxooctanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone           | 3-O-C <sub>8</sub> -HSL   | 241,28                |
| (3-oxodecanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone           | 3-O-C <sub>10</sub> -HSL  | 269,34                |
| (3-oxododecanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone         | 3-O-C <sub>12</sub> -HSL  | 297,39                |
| N-(3-oxotetradecanoyl)- <i>L</i> -homosérine lactone    | 3-O-C <sub>14</sub> -HSL  | 325,44                |

#### 4.8.1. Effet des AHLs exogènes sur la luminescence

L’effet des AHLs exogènes sur la luminescence a été testé en utilisant des microplaques blanches à 96 puits. Une culture en phase post exponentielle de *S. woodyi* sauvage ou  $\Delta luxI$  dans du VNSS a été ajoutée dans des microplaques après un ajustement de la DO<sub>600nm</sub> à 0,3. Chaque molécule d’AHL a été ensuite ajoutée de façon à avoir une concentration de 25, 50 ou 100  $\mu$ M en ajoutant 10% v/v d’AHL par rapport au volume bactérien. Après 15 h d’incubation des microplaques sous agitation (120 rpm) à 20°C dans des conditions humides, la luminescence et la DO<sub>600nm</sub> ont été mesurées en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infini M 200 pro). Trois types de contrôles ont été utilisés dans cette expérience : un contrôle négatif constitué du milieu de culture stérile, un contrôle

comprenant l'inoculum bactérien avec l'ajout de 10% v/v de VNSS et un dernier contrôle permettant d'évaluer l'effet du solvant utilisé dans la dissolution d'AHLs, composé d'un inoculum bactérien mélangé avec 10% v/v de VNSS supplémenté avec 1% DMSO. Chaque essai a été fait en triplicat expérimental et biologique. De plus, un suivi de la luminescence sur 24 h de *S. woodyi* sauvage en présence ou en absence de 25, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de C<sub>8</sub>-HSL a été effectué dans les mêmes conditions.

#### 4.8.2. Effet des AHLs exogènes sur l'adhésion et la formation du biofilm

L'effet des AHLs exogènes sur l'adhésion et la formation du biofilm par *S. woodyi* a été testé selon les protocoles cités dans les parties [4.3.1](#) et [4.3.2](#) (Page 155) en ASW. Chaque molécule d'AHL a été ajoutée de façon à avoir une concentration de 25  $\mu\text{M}$  en ajoutant 10% v/v d'AHL par rapport au volume bactérien. Chaque essai a été réalisé en triplicat expérimental et biologique. Des puits contenant de milieu de culture stérile ou d'inoculum bactérien avec 10% v/v d'ASW pure ou supplémentée avec 1% de DMSO ont été utilisés comme contrôles expérimentaux dans ces essais.

#### 4.9. Effet d'AI2 exogène sur la luminescence de *S. woodyi*

L'effet d'AI2 exogène sur la luminescence de *S. woodyi* sauvage a été réalisé dans du MB selon les mêmes démarches expérimentales utilisées avec les AHLs.

L'AI2 n'étant pas commercialisée, un surnageant de la souche *V. harveyi* BB475 collecté pendant la phase post-exponentielle de croissance a été utilisé comme source d'AI2 exogène ; une culture de BB475 dans du MB supplémenté avec 25  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine a été incubée sous agitation (170 rpm) à 30°C. Après 7h d'incubation, une centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min a été effectuée. Le surnageant a été filtré (0,22  $\mu\text{m}$ ) et stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Le temps d'incubation de 7 h qui correspond à l'émission maximale de la luminescence par *V. harveyi* a été choisi suite à un suivi de la croissance et de la luminescence de *V. harveyi* BB120 dans les mêmes conditions de croissance utilisées pour celles de BB475.

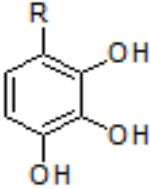
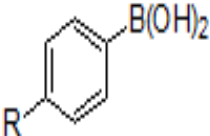
Brièvement, 10% v/v du surnageant de BB475 ont été ajoutés sur des puits de microplaque contenant une culture de *S. woodyi* sauvage en phase post exponentielle de croissance dans du MB avec une DO<sub>600nm</sub> ajustée à 0,3. La luminescence a été évaluée après 15 h d'incubation à 20°C et 120 rpm en utilisant le lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro).

#### 4.10. Effet des molécules QSI commerciales sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm de *S. woodyi*

Les molécules commerciales utilisées dans cette partie sont citées dans le tableau 19. Ces molécules (*ThermoFisher scientific*) ont été préparées à une concentration stock de 10 mM dans un milieu de culture stérile (VNSS ou ASW) supplémenté avec 10% v/v de DMSO et ces suspensions ont été stockées à -20°C. Les molécules ont été testées d'abord sur la luminescence de *S. woodyi* sauvage et seules celles ayant un effet sur la luminescence ont été testées ultérieurement sur l'adhésion et la formation du biofilm.

La démarche expérimentale utilisée est similaire à celle citée dans la partie 4.8 avec quelques différences. L'effet des molécules à des concentrations de 25, 50 et 100 µM a été évalué sur l'adhésion et la formation de biofilm.

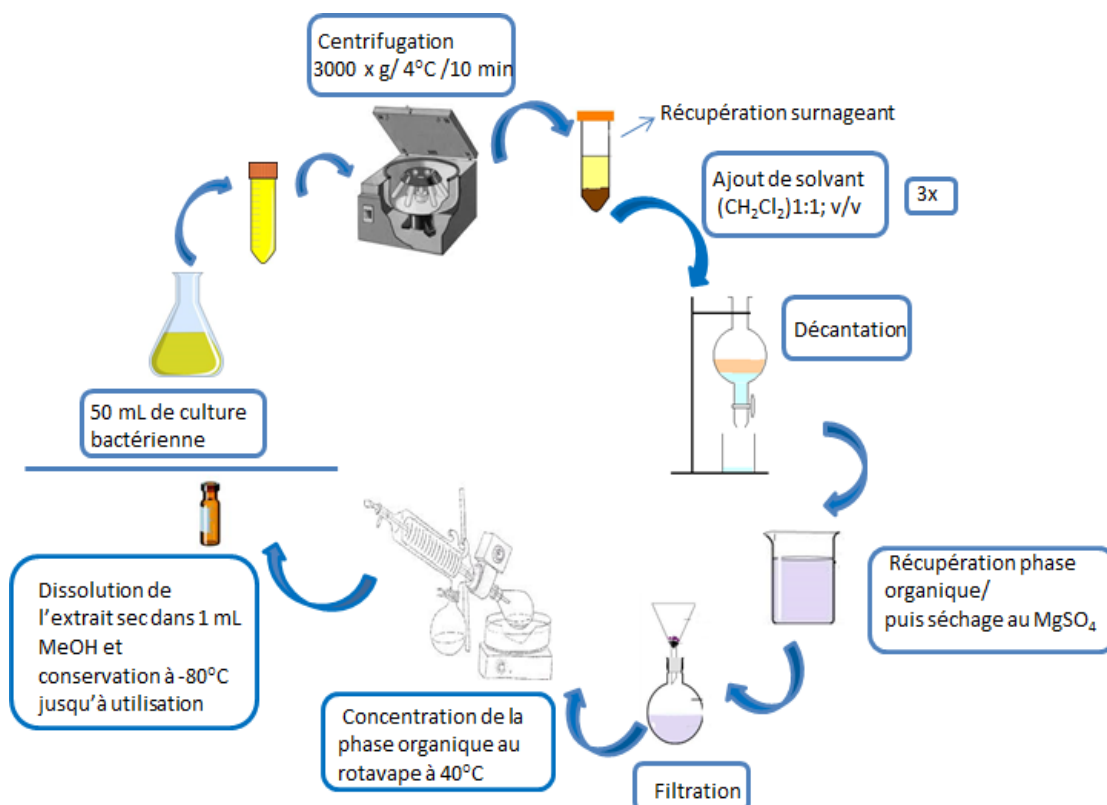
**Tableau 19.** Les molécules QSI utilisées dans cette étude.

| Molécule (Appellation)                                                                                                                                                  | Structure                                                                            | Références                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Pyrogallol ( <b>Mol 1</b> ) R = H<br>2,3,4 trihydroxybenzaldehyde ( <b>Mol 2</b> ) R = CHO                                                                              |  | (Ni, Choudhary, <i>et al.</i> , 2008) |
| 4-Methoxycarbonylphenylboronic acid ( <b>Mol 3</b> )<br>R=CH <sub>3</sub> CO<br>4-(benzyloxy)phenylboronic acid ( <b>Mol 4</b> )<br>R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O |  | (Ni, Chou, <i>et al.</i> , 2008)      |

#### 4.11. Extraction des AHLs

L'extraction des AHLs synthétisées par *S. woodyi* sauvage, *A. tumefaciens* KYC6 et *C. violaceum* CV31532 a été effectuée selon le protocole utilisé par Ayé *et al* en 2015 (Figure 54) (Ayé *et al.*, 2015). Pour ce faire, 50 ml de culture bactérienne en phase post exponentielle de croissance (dans du VNSS pour *S. woodyi*, du LB pour CV026 et du LB supplémenté avec 50 µg/ml spectinomycine et 4,5 µg/ml tétracycline pour A136) ont été centrifugés à une température de 4°C pendant 10 min à 6000 rpm. Le surnageant a été extrait ensuite trois fois avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique résultante (150 ml) a été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre (Sigma-Aldrich), filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif

(Rotavapor) à 40°C. L'extrait sec obtenu a été dissous dans 1 ml de méthanol HPLC-grade (VWR, France).



**Figure 54.** Représentation schématique du protocole d'extraction des AHLs à partir de solvants organiques (Aye, 2015).

#### 4.12. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à la spectrométrie de masse est une autre approche complémentaire à l'utilisation des biosenseurs, pour détecter l'un ou les AHL(s) synthétisée(s) par *S. woodyi*. En plus de la détection de la présence éventuelle d'AHLs, cette approche permet surtout une identification précise de la molécule d'AHL présente.

Cette approche a été réalisée selon la démarche expérimentale utilisée par Mireille Ayé dans sa thèse (Aye, 2015). Brièvement, 25 µl d'extrait de *S. woodyi* sauvage obtenu comme décrit précédemment ont été injectés dans la colonne de chromatographie (MerckPurospher STAR RP18, 5 µm, 125 × 4mm) à un débit de 0,5 mL/min. Une programmation binaire d'eau et d'acétonitrile (MeCN) acidifiés avec 0,1% d'acide formique a été utilisée de la manière suivante pour effectuer l'élution :

- (i) Un palier isocratique initial de 10 min : 10% de MeCN dans l'eau (v/v)



- (ii) Un gradient linéaire conduisant à 100% de MeCN en 30 min
- (iii) Un palier isocratique final de 10 min : 100% de MeCN
- (iv) Retour aux conditions initiales (1 min)
- (v) Équilibrage de la colonne (5 min).

Afin de détecter la présence d'éventuelles AHLs, trois mélanges d'AHLs commerciales regroupées selon leur substitution (AHLs non substituées et AHLs substituées soit par un groupement hydroxyle soit par un groupement carbonyle) ([Tableau 18](#), page 164) ont été injectés successivement dans la colonne et élués de la même façon que l'extrait de *S. woodyi*. Les mélanges ont été préparés en combinant dans chaque cas, 200  $\mu$ l de 5 molécules commerciales d'AHL, solubilisées dans du méthanol (VWR, qualité HPLC) à une concentration de 1 mg/ml.

Les résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel *data analysis* 4,3 (Bruker) en se basant sur le temps de rétention ( $T_r$ ) et l'ion pseudo moléculaire  $[M+H]^+$  caractéristique de chaque molécule d'AHL. Les fragments d'ion caractéristique  $m/z$  102, dérivés du groupement lactone ont été utilisés comme preuve de la présence d'AHLs.

## 5. Références bibliographiques

- Aye, A.M. (2015) Evidence of an AHL-based communication system quorum sensing in marine bacteria isolated from the Mediterranean Sea. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01233256>.
- Ayé, M.A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Koffi Nevry, R., *et al.* (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology* **161**: 2039–2051.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043–4045.
- Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**: 273–286.
- Eguchi, M., Nishikawa, T., MacDonald, K., Cavicchioli, R., Gottschal, J.C., and Kjelleberg, S. (1996) Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1287–1294.
- Green, R., and Rogers, E.J. (2013) Chemical Transformation of *E. coli*. *Methods Enzymol* **529**: 329–336.
- Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Boon, E.M. (2012) Nitric Oxide Regulation of Cyclic di-GMP Synthesis and Hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry (Mosc)* **51**: 2087–2099.
- Makemson, J.C., Fulayfil, N.R., Landry, W., Van Ert, L.M., Wimpee, C.F., Widder, E.A., and Case, J.F. (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**: 1034–1039.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., *et al.* (2008) Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *PLOS ONE* **3**: e2744.
- 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.
- Murakawa, T., YAMAGATA, H., TSURUTA, H., and AIZONO, Y. (2002) Cloning of Cold-active Alkaline Phosphatase Gene of a Psychrophile, *Shewanella* sp., and Expression of the Recombinant Enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 754–761.
- Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., Lu, C.-D., Tai, P.C., and Wang, B. (2008) Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 590–594.
- Ni, N., Choudhary, G., Li, M., and Wang, B. (2008) Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 1567–1572.

Sukovich, D.J., Seffernick, J.L., Richman, J.E., Hunt, K.A., Gralnick, J.A., and Wackett, L.P. (2010) Structure, Function, and Insights into the Biosynthesis of a Head-to-Head Hydrocarbon in *Shewanella oneidensis* Strain MR-1. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3842–3849.

Surette, M.G., and Bassler, B.L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 7046–7050.

Widmer, K.W., Soni, K.A., Hume, M.E., Beier, R.C., Jesudhasan, P., and Pillai, S.D. (2007) Identification of Poultry Meat-Derived Fatty Acids Functioning as Quorum Sensing Signal Inhibitors to Autoinducer-2 (AI-2). *J Food Sci* **72**: M363–M368.

Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the Autoinducer 3-Oxo-octanoyl-Homoserine Lactone Strongly Inhibit Activity of the TraR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 5398–5405.

## *Chapitre III*

*S. woodyi* sécrète la C<sub>8</sub>-HSL pour réguler sa bioluminescence mais pas son biofilm



## 1. Introduction

Bien que les bactéries luminescentes soient abondantes dans le milieu marin (Reichelt and Baumann, 1973), les mécanismes moléculaires impliqués dans la luminescence n'ont été décrits que pour un nombre limité d'espèces comme *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), *V. fischeri* (Egland and Greenberg, 1999) et *V. campbellii* (Liu Zhu *et al.*, 2012). Malgré les différences constatées entre les différents mécanismes identifiés, un facteur commun a été retrouvé, c'est la présence d'un ou de plusieurs systèmes QS contrôlant la luminescence chez ces bactéries.

Le QS est un système de communication bactérienne permettant la synchronisation d'expressions génétiques en fonction de la densité cellulaire au sein d'une population bactérienne. Il met en jeu une ou plusieurs molécules signal telles que l'AHL, l'AI2 et le CAI-1 (Miller and Bassler, 2001). En plus de son rôle dans la régulation de la luminescence, le QS a été identifié comme un régulateur de plusieurs phénotypes ou processus bactériens comme la virulence, la résistance aux antibiotiques et la formation du biofilm (Van Houdt *et al.*, 2004; Bagert *et al.*, 2016). La formation de biofilm pose de nombreux problèmes pour l'activité humaine en environnement marin, où elle constitue les conditions favorables à la formation du biofouling en milieu marin par exemple. Dans le secteur médical, la formation de biofilm participe à la virulence et la résistance bactérienne aux antibiotiques (Labbate *et al.*, 2004; You *et al.*, 2007; Dobretsov *et al.*, 2011). Plusieurs études ont été réalisées afin de caractériser les systèmes de QS chez diverses espèces bactériennes appartenant ou non à l'environnement marin telles que *V. cholerae* (Waters *et al.*, 2008), *P. aeruginosa* (Waters and Bassler, 2005) et plusieurs espèces isolées à partir de la rade de Toulon (France) (Aye, 2015).

Sachant que la formation de biofilm est un processus hautement régulé au niveau génétique et pour lequel la complexité vient de l'interconnexion entre différents systèmes ou réseaux comme le QS, le c-di-GMP et les petits ARN régulateurs, la relation entre QS et biofilm reste difficile à exploiter chez certaines espèces bactériennes (Wolska *et al.*, 2016).

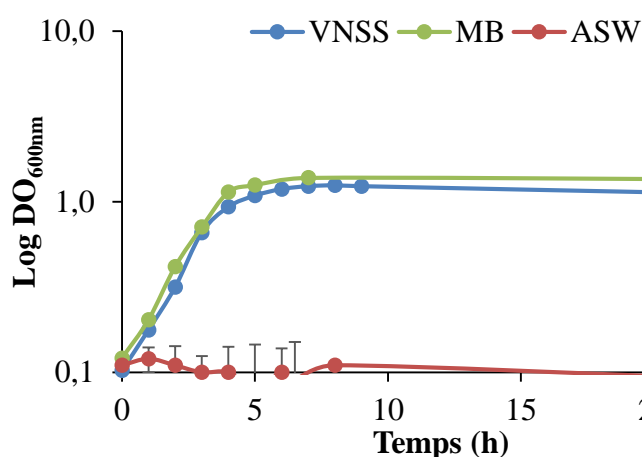
Ce chapitre porte sur la caractérisation d'un système QS de type AI1 fonctionnel chez la bactérie marine *S. woodyi*. Le rôle de ce système de communication mettant en jeu une molécule d'AHL a été caractérisé chez *S. woodyi* en premier temps sur la luminescence, la mobilité, l'adhésion et la formation du biofilm ainsi que la colonisation d'une souche

amibienne *A. castellanii*. Dans un second temps, l'effet de certaines AHLs commerciales sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi* a été testé.

## 2. Résultats préalables

### 2.1. Conditions de croissance de *S. woodyi*

Puisque le modèle du genre *Shewanella*, *S. oneidensis* MR1 ainsi que *S. frigidimarina* NCIMB400 sont capables de pousser sur du LB (Learman *et al.*, 2009; Linares *et al.*, 2016), la croissance de *S. woodyi* MS32 a été testée dans le milieu LB soit par un ensemencement de *S. woodyi* sur un milieu gélosé de LB à partir de son cryotube congelé à -80°C, soit par une culture liquide à partir d'une colonie isolée sur le milieu MB adapté à la croissance de *S. woodyi* (Liu Niu *et al.*, 2012). Dans les deux cas, aucune croissance n'a été observée. Par conséquent, la croissance de *S. woodyi* a été étudiée dans deux milieux de culture spécifiques pour les bactéries marines, VNSS et MB (Figure 55) afin de déterminer le temps nécessaire à *S. woodyi* pour atteindre la phase post exponentielle. Pareillement, *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 étant capable de développer un biofilm dans l'eau de mer artificielle ASW (mais non de croître planctoniquement) (Learman *et al.*, 2009; Linares *et al.*, 2016) et parce que ce milieu est généralement utilisé lors des tests d'adhésion et de formation du biofilm au laboratoire (Aye, 2015; Linares *et al.*, 2016), ce milieu a également été testé (Figure 55).



**Figure 55.** Suivi de la croissance de *S. woodyi* en conditions planctoniques dans de VNSS, MB et ASW. Une pré-culture de *S. woodyi* en VNSS ou MB a été diluée dans le même milieu pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,1 et incubée ensuite dans un Erlenmeyer à 20°C et 120 rpm. Dans le cas d'ASW, une pré-culture de *S. woodyi* en VNSS a été centrifugée pendant 10 min à 6000 rpm et le culot a été récupéré dans de l'ASW. La culture a été incubée ensuite dans un Erlenmeyer à 20°C et 120 rpm après un ajustement de la DO<sub>600nm</sub> à 0,1. La croissance (DO<sub>600nm</sub>) a été mesurée toutes les heures pendant 24 h en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Scientific, Genesys 20). Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

Les résultats affichés dans la figure 55 montrent que la croissance de *S. woodyi* est semblable dans les milieux VNSS et MB : *S. woodyi* a une courbe de croissance bactérienne classique dans ces 2 milieux avec une phase exponentielle située entre 2 et 5 h et une phase post exponentielle de croissance située entre 5 et 7 h. En revanche, aucune croissance de *S. woodyi* n'est observée dans le milieu minimum ASW pendant 24 h.

Selon la littérature, le QS est induit à forte densité cellulaire et la concentration d'auto-inducteurs atteint un maximum pendant la phase post exponentielle de croissance (Nilsson *et al.*, 2001; Henke and Bassler, 2004; Fekete *et al.*, 2010). En se basant sur ces informations, un temps d'incubation de 7 h a été choisi afin d'effectuer les extractions d'éventuelles AHLs synthétisées par cette bactérie.

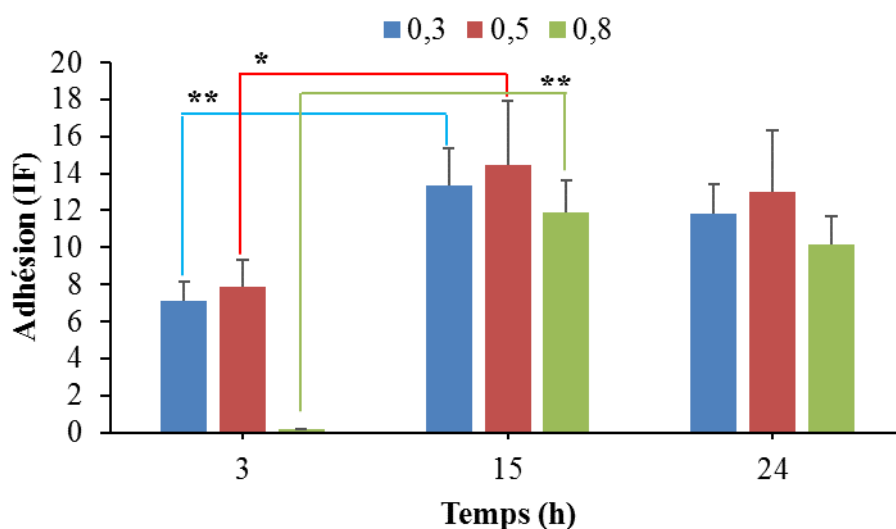
## 2.2. Conditions de l'adhésion et de la formation de biofilm chez *S. woodyi*

Les processus d'adhésion et de formation de biofilm sont des stratégies de survie utilisées à peu près par toutes les bactéries qui permettent aux microorganismes d'accéder plus facilement aux nutriments et de se protéger contre les différents stress environnementaux (Dunne, 2002). Par exemple, dans les écosystèmes aquatiques naturels, les microorganismes associés à une surface sont nettement plus nombreux que les organismes en suspension (Chellaram *et al.*, 2012). Ceci peut être expliqué par le fait que les nutriments dans ces écosystèmes ont tendance à se concentrer près d'une surface solide (Davey and O'toole, 2000; Dunne, 2002). La fixation bactérienne à une surface peut être divisée en plusieurs phases distinctes : l'adhésion primaire réversible, l'adhésion secondaire irréversible et la formation du biofilm (Teughels *et al.*, 2006). Chacune de ces phases est contrôlée génétiquement par l'action d'un ou de plusieurs systèmes tels que le QS ou le c-di-GMP. Plusieurs auteurs ont rapporté le rôle de QS dans la régulation de ces différentes phases chez plusieurs espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa* (De Kievit *et al.*, 2001), *S. liquefaciens* MG1 (Labbate *et al.*, 2004), *V. anguillarum* (You *et al.*, 2007), *S. baltica* (Wang *et al.*, 2017) et *Pantoea stewartii* causant la maladie de Stewart chez les plantes de maïs (Koutsoudis *et al.*, 2006).

Un des objectifs de ce travail est de déterminer le rôle régulateur de QS s'il existe, dans l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi* dans le but de trouver à plus long terme des molécules pouvant inhiber la formation du biofilm chez cette bactérie en ciblant le QS. Afin de choisir les meilleures conditions expérimentales permettant d'étudier l'état



sessile de *S. woodyi*, un suivi de l'adhésion sur 24 h a été effectué dans le milieu ASW en utilisant plusieurs  $DO_{600nm}$  de départ, 0,3, 0,5 et 0,8 (Figure 56). Parallèlement, un suivi de la formation du biofilm a été réalisé sur 72 h dans les deux milieux VNSS et ASW en partant également de plusieurs  $DO_{600nm}$  initiales, 0,01, 0,1, 0,3, 0,5, 0,8 et 1 (Figure 57). L'intérêt de tester plusieurs concentrations bactériennes de départ est de choisir la concentration d'inoculum bactérien permettant d'obtenir un maximum d'adhésion et de biofilm dans ces conditions. Les résultats de ces deux suivis sont affichés dans les figures 56 et 57.

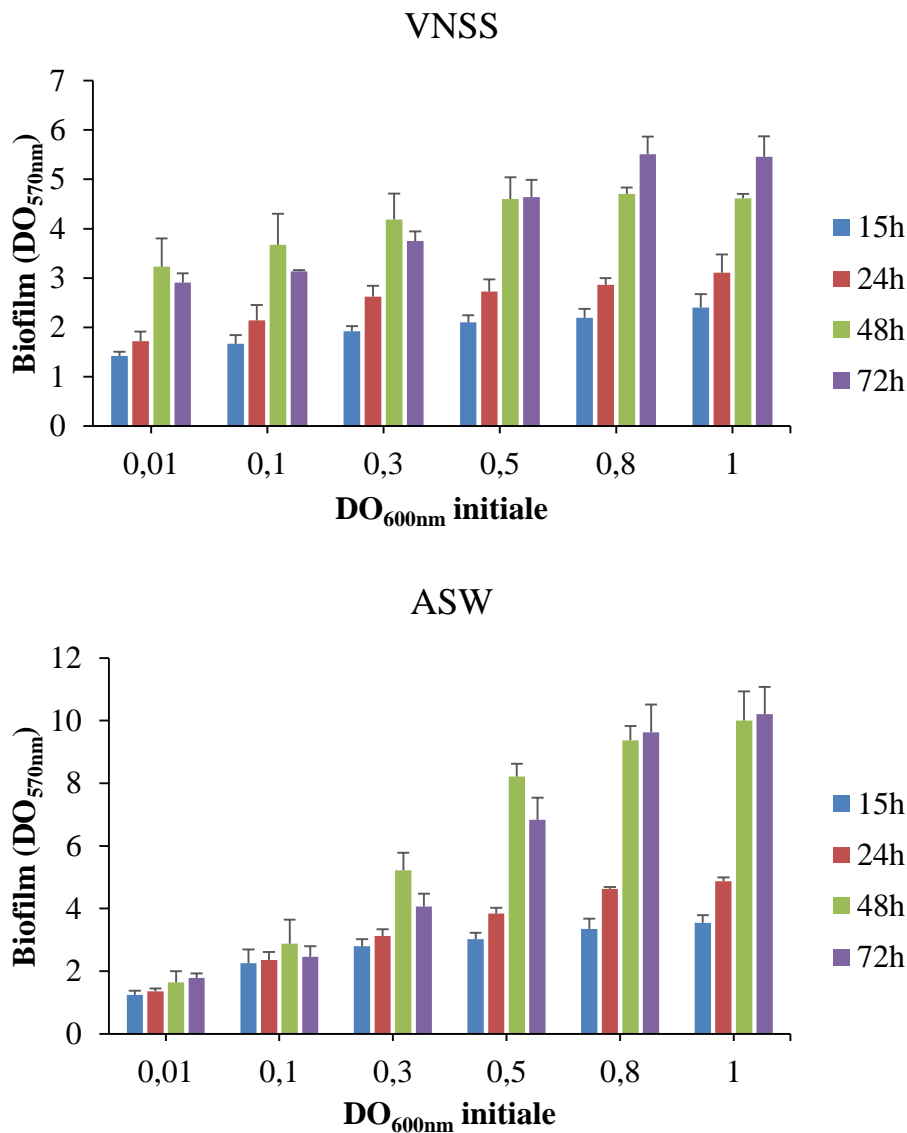


**Figure 56.** Suivi d'adhésion de *S. woodyi* en ASW.

Une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance a été centrifugée 10 min à 6000 rpm, le culot a ensuite été resuspendu en ASW et dilué de telle sorte à obtenir trois  $DO_{600nm}$  différentes : 0,3, 0,5 et 0,8. Les cultures diluées ont été ensuite incubées à 20°C en conditions statiques dans des microplaques noires de 96 puits. L'adhésion a été évaluée après 3, 15 et 24 h d'incubation par mesure de la fluorescence ( $\lambda$  excitation=475 nm et  $\lambda$  émission=510 nm) en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro) après un marquage par le Syto9. Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les conditions marquées d'astérisques sont significativement différentes (Bonferroni; \*\* : $p < 0,01$ ; \* : $p < 0,05$ ).

La figure 56 montre que *S. woodyi* a une capacité d'adhésion non négligeable dès 3 h excepté lorsque la  $DO_{600nm}$  initiale est de 0,8. Ce qui peut être expliqué par le fait qu'au-delà d'une certaine concentration bactérienne, une compétition à adhérer sur la surface en question s'établit ce qui inhibe l'adhésion bactérienne précoce. L'adhésion atteint un maximum après 15 h d'incubation pour les trois inoculum (0,3, 0,5 et 0,8) et aucune différence significative n'est observée entre 15 et 24 h dans les trois cas. Puisque les valeurs sont importantes à 15 h et qu'il est difficile de distinguer la phase d'adhésion de la phase de formation de biofilm, le temps le plus précoce, 15 h, a été sélectionné pour la suite des expérimentations relatives à l'adhésion de *S. woodyi*. En revanche concernant le choix de l'inoculum, la plus petite valeur de  $DO_{600nm}$  donnant la plus forte adhésion, c-à-d la  $DO_{600nm}$  de 0,3, a été choisie. Donc, un

temps d'incubation de 15 h et une  $DO_{600nm}$  de 0,3 sont les conditions expérimentales utilisées pour effectuer nos expériences d'adhésion de *S. woodyi*.



**Figure 57.** Suivi de la formation de biofilm de *S. woodyi* en VNSS et ASW.

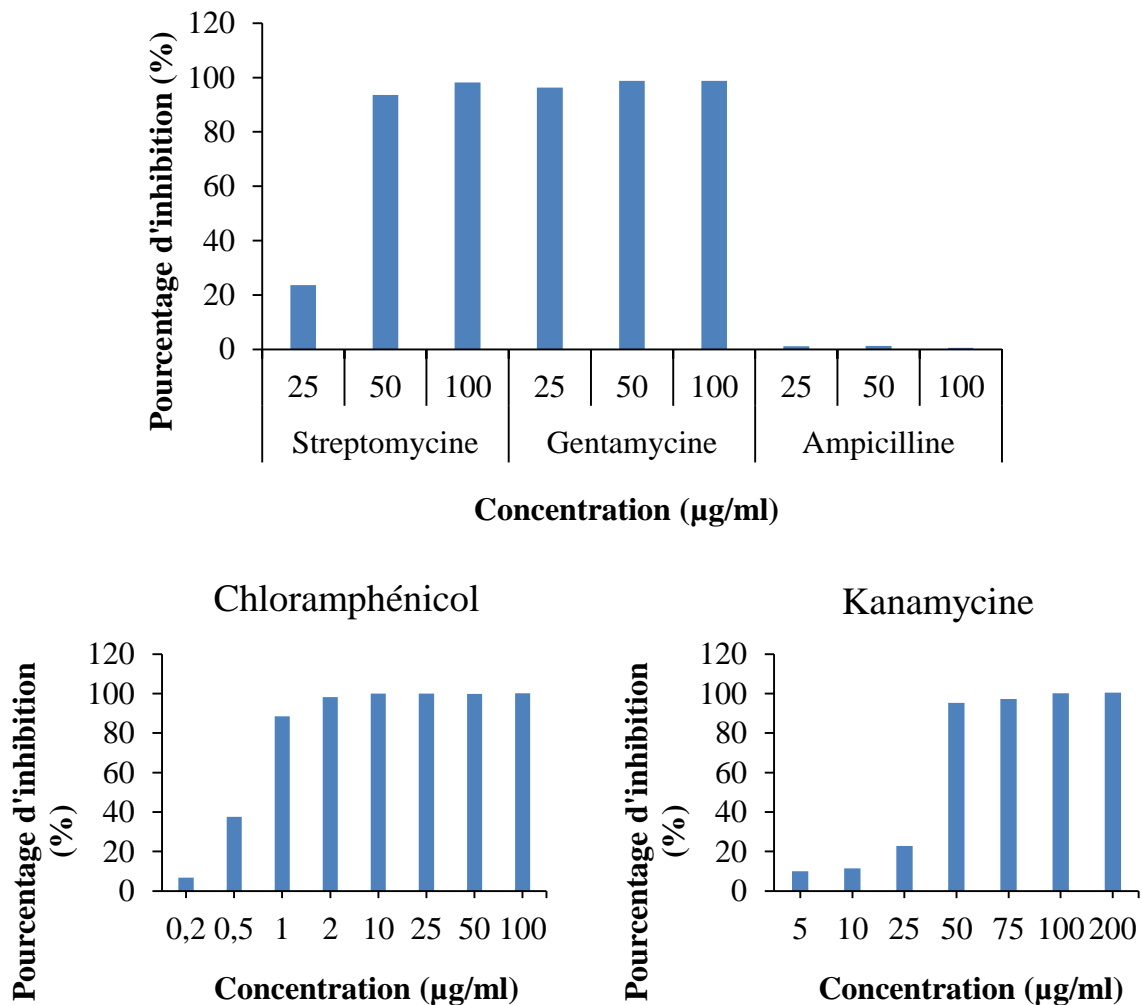
Une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été diluée dans le même milieu pour obtenir plusieurs  $DO_{600nm}$ , 0,01, 0,1, 0,3, 0,5, 0,8 et 1. Les cultures diluées ont été ensuite incubées à 20°C sans agitation dans des microplaques transparentes à 96 puits. La quantification du biofilm formé au fond des puits a été évaluée après 15, 24, 48 et 72 h d'incubation en mesurant la  $DO_{570nm}$  en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro) après un marquage au cristal violet. Pour le suivi de la formation de biofilm en ASW, la même démarche expérimentale a été effectuée mais dans ce cas, la culture de *S. woodyi* en VNSS a été centrifugée à 6000 rpm pendant 10 min et le culot resuspendu puis dilué en ASW. Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

La figure 57 montre le suivi de la formation de biofilm formé par *S. woodyi* pendant 72 h dans les milieux VNSS et ASW. Dans ces deux milieux, le profil de formation du biofilm est semblable bien que des valeurs plus élevées soient observées en ASW, qui est un milieu salin pauvre en source de carbone. L'observation d'une formation plus importante de biofilm en milieu ASW par rapport à des milieux riches comme le VNSS ou le LB a déjà été

faite par le passé au laboratoire avec une autre souche de *Shewanella* (Learman *et al.*, 2009; Linares *et al.*, 2016). En VNSS et en ASW, les valeurs associées à la formation du biofilm augmentent progressivement avec le temps pour atteindre un plafond après 48 h d'incubation. Dans la mesure où notre objectif est aussi d'utiliser ce test pour évaluer l'inhibition du biofilm par des molécules potentiellement inhibitrices, le choix de la DO<sub>600nm</sub> s'est reporté sur la DO<sub>600nm</sub> initiale de 0,5 pour ne pas prendre une DO<sub>600nm</sub> initiale trop élevée mais aussi afin d'obtenir une formation de biofilm suffisamment importante pour visualiser une inhibition. Pour les expériences ultérieures relatives à la formation du biofilm en ASW, ont donc été choisi le temps d'incubation de 48 h et la DO<sub>600nm</sub> de 0,5.

### **2.3. Conditions d'utilisation des antibiotiques**

Plusieurs expérimentations de biologie moléculaire nécessitant l'utilisation d'antibiotiques ont été réalisés dans cette étude. La sensibilité de *S. woodyi* MS32 vis-à-vis de ces antibiotiques a donc été évaluée. La figure 58 montre les résultats obtenus avec les antibiotiques testés.



**Figure 58.** Sensibilité de *S. woodyi* vis-à-vis de différents antibiotiques : streptomycine, gentamycine, ampicilline, chloramphénicol et kanamycine.

Une pré-culture de *S. woodyi* en MB a été diluée dans le même milieu pour obtenir une  $DO_{600nm}$  de 0,1. La culture a été distribuée ensuite dans des flasques de 30 ml (5 ml/flasque) et plusieurs concentrations d'antibiotiques ont été ajoutées. Après 24 h d'incubation à 20°C et 120 rpm, la  $DO_{600nm}$  a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre (*Thermo Scientific*, Genesys 20) et les valeurs obtenues ont été comparées avec le témoin (culture ne contenant aucun antibiotique).

La figure 58 montre le pourcentage d'inhibition de la croissance de *S. woodyi* en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. Les résultats indiquent que *S. woodyi* est une souche résistante à l'ampicilline ( $Amp^r$ ) puisque 100 µg/ml de cet antibiotique ne sont pas suffisants pour inhiber sa croissance. Par contre, 50 µg/ml de streptomycine, 25 µg/ml de gentamycine et 10 µg/ml de chloramphénicol sont suffisants pour inhiber complètement la croissance de cette bactérie. *S. woodyi* est également sensible à la kanamycine, une concentration de 50 µg/ml est suffisante pour inhiber à 100% la croissance. Une concentration de 100 µg/ml de kanamycine et 25 µg/ml d'ampicilline ont ainsi été utilisées pour sélectionner les souches ayant intégrées le plasmide pSMV3  $\Delta luxR$  ou pSMV3  $\Delta luxI$  pendant la construction des mutants  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$ . L'utilisation d'ampicilline dans ce cas permet

d'éliminer la souche d'*E. coli* WM3064 pouvant éventuellement croître sur le milieu de sélection en absence de DAP.

### 3. Article

*S. woodyi* est une espèce marine luminescente appartenant au genre *Shewanella* connu pour son importance dans les processus de biorémediation. Les informations concernant cette bactérie sont limitées à quelques études seulement. *S. woodyi* est une bactérie Gram-, isolée en 1997 à partir d'échantillons d'eau prélevés à une profondeur de 200 à 300 m dans la mer d'Alboran. Makemson *et al* ont rapporté que c'est une bactérie aérobie, non sporulante, poussant à une température située entre 4 et 25°C, possédant un flagelle polaire. Elle peut utiliser l'oxygène, le nitrate ou le nitrite comme un accepteur terminal d'électron (Makemson *et al.*, 1997). Le génome de *S. woodyi* a été séquencé complètement par Copeland *et al* en 2008 (Copeland *et al.*, 2008). Liu *et al* ont montré en 2012 le rôle de c-di-GMP dans la régulation de la formation du biofilm chez cette bactérie (Niu Liu *et al.*, 2012). Bien que la luminescence de *S. woodyi* suggère la présence d'un ou de plusieurs systèmes QS contrôlant l'émission de la luminescence comme c'est le cas de la plupart des bactéries luminescentes caractérisées telles que *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), *V. fischeri* (England and Greenberg, 1999) et *V. campbellii* (Liu Zhu *et al.*, 2012), aucune étude concernant la caractérisation du système QS de cette bactérie n'a été réalisée.

Dans cet article, nous avons identifié premièrement que la luminescence de *S. woodyi* est en corrélation directe avec sa croissance dont aucune luminescence n'a été observé dans le milieu minimum ASW qui ne permet pas une croissance de *S. woodyi*. Par contre, un maximum d'émission de luminescence a été observé après 7 h, pendant la phase post exponentielle de croissance dans les deux milieux riches VNSS et MB (Figure 1 de l'article). Ce qui suggère la présence d'un ou de plusieurs systèmes QS contrôlant la luminescence chez *S. woodyi*.

L'opéron *lux* permettant la luminescence de *S. woodyi* a été identifié ensuite par homologie de séquence avec les opérons *lux* présents chez les bactéries luminescentes. Cet opéron *lux* contient 6 gènes *luxCDABEG* (de Swoo\_3633 jusqu'à Swoo\_3638). Les gènes *luxA* et *luxB* sont les gènes codant respectivement pour les deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase, tandis que les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse d'aldéhyde et *luxG* code pour une protéine impliquée dans la synthèse de la flavine réduite FMNH<sub>2</sub>. L'émission de luminescence de *S. woodyi* est observée dans des

milieux de culture riche comme le VNSS et le MB et est corrélée avec la densité cellulaire (Figure 1 de l'article). Le pic de luminescence est observé à l'entrée en phase stationnaire. Un surnageant de culture de *S. woodyi* collecté pendant la phase post exponentielle induit la luminescence, ce qui suggère que l'expression de l'opéron *lux* est contrôlée par la sécrétion et la réception d'une ou plusieurs substances extracellulaires (Figure 2 de l'article).

Un système AHL contrôlant la luminescence, et donc l'expression de l'opéron *lux* chez *S. woodyi* a été identifié. Le génome séquencé de cette bactérie contient un gène *luxI* (Swoo\_2998) codant pour la synthèse d'AHL, LuxI, associé à un gène *luxR* (Swoo\_2997) codant pour le récepteur d'AHL, LuxR. Ces deux gènes sont retrouvés éloignés de l'opéron *lux* mais une *lux box*, site de fixation de LuxR sur l'ADN a été retrouvée dans la séquence promotrice des gènes *luxI*, *luxR* et l'opéron *lux* (Figure 3 de l'article). La mutation du gène *luxI* (Swoo\_2998) ou du gène *luxR* (Swoo\_2997) abolit la luminescence de *S. woodyi*. L'utilisation de la RT-qPCR a permis de vérifier d'une part l'absence d'expression de l'opéron *lux* dans la souche mutante *S. woodyi*  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  (Figure 5 de l'article) et de constater la présence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre *luxR* et *luxI*, aucune expression de *luxR* n'a été observée dans la mutante *luxI* et vice-versa.

Après la mise en évidence d'un système AHL contrôlant la luminescence de *S. woodyi* via les produits des gènes *luxI* et *luxR*, la capacité de *S. woodyi* à synthétiser une ou plusieurs molécules d'AHLs a été vérifiée en utilisant des bactéries biosenseurs et par LCMS. L'utilisation des bactéries biosenseurs, *V. harveyi* BB475 (biosenseur de 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL), *C. violaceum* CV026 (biosenseur d'AHLs à chaîne latérale courte, plus petite ou égale à 6 carbones) et *A. tumefaciens* A136 (biosenseur d'AHLs à chaîne latérale longue, plus grande ou égale à 8 carbones) a permis de constater la synthèse d'une ou plusieurs molécules d'AHLs à chaîne latérale longue. En effet, *S. woodyi* induit seulement la réponse de la bactérie *A. tumefaciens* A136 tandis qu'aucune réponse n'a été observée dans le cas de *V. harveyi* BB475 et *C. violaceum* CV026 (Figure 6 de l'article). Des expériences de LCMS ont ensuite permis de caractériser la ou les molécules d'AHLs synthétisées en utilisant des AHLs standards substituées ou non par un groupement carbonyle ou hydroxyle avec une chaîne latérale comprise entre 4 et 14 carbones. Seule la présence de C<sub>8</sub>-HSL dans le surnageant de *S. woodyi* a été observée (Figure 7 de l'article) indiquant que *S. woodyi* synthétise la C<sub>8</sub>-HSL. Seule la C<sub>8</sub>-HSL est capable d'induire de manière dose dépendante la luminescence de *S. woodyi* et de compléter une souche de *S. woodyi*  $\Delta luxI$  (Figure 8 de l'article).

*S. woodyi* est une bactérie formatrice de biofilm (Niu Liu *et al.*, 2012) et sachant que le QS contrôle dans la plupart des cas la formation du biofilm bactérien, la relation entre le système AHL de QS et la formation du biofilm chez *S. woodyi* a été étudiée. Nos résultats indiquent que l'adhésion et la formation de biofilm chez *S. woodyi* semblent être indépendants du système AHL de QS dans les conditions testées dans cet article. L'inactivation par mutation de *luxR* ou *luxI* ne semble pas influencer sur l'adhésion ou sur la formation du biofilm quel que soit le milieu de culture testé (VNSS, MB et ASW) et aucune molécule d'AHLs y compris la C<sub>8</sub>-HSL n'a modifié l'adhésion ou la formation de biofilm dans les conditions testées (Figure 9 de l'article).

Cet article soumis à la publication est présenté dans les pages ci-après.

1 **The marine bacterium *S. woodyi* secretes C<sub>8</sub>-HSL to**  
2 **regulate bioluminescence**

3 **Mahmoud Hayek<sup>1</sup>, Claudine Baraquet<sup>1</sup>, Raphaël Lami<sup>2</sup>, Yves Blache<sup>1</sup> et Maëlle**  
4 **Molmeret<sup>1</sup>**

5 <sup>1</sup>Laboratoire MAPIEM, EA4323, Université de Toulon, La Garde, France

6 <sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et  
7 Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, Banyuls/Mer, France

8 **Correspondence:**

9 Maëlle Molmeret, Laboratoire MAPIEM EA 4323, Université de Toulon

10 Avenue de l'université - BP 20132, 83957 La Garde Cedex

11 E-mail: molmeret@univ-tln.fr

12 **Co-authors e-mails:**

13 hayek@univ-tln.fr

14 baraquet@univ-tln.fr

15 raphael.lami@obs-banyuls.fr

16 blache@univ-tln.fr

17 molmeret@univ-tln.fr

18 **Keywords:** Marine bacteria, *Shewanella woodyi*, Quorum Sensing, luminescence, biofilm

19 **Running title:** *S. woodyi* secretes C<sub>8</sub>-HSL to regulate bioluminescence



20

## 21 **Abstract**

22 Quorum sensing (QS) or cell-to-cell communication is a process by which bacteria produce  
23 and detect signal molecules and thereby coordinate their behavior in a cell-density dependent  
24 manner. *S. woodyi* MS32 has been identified as the luminous bacteria. However, very little  
25 information is known on this bacterium, in particular if its luminescence as well as biofilm  
26 formation are controlled by QS. In this study, we have demonstrated that *S. woodyi* MS32  
27 emits luminescence in its rich growing media in planktonic conditions as well as in sessile  
28 conditions. A mutation of the AHL system genes, the *luxI* synthase or the *luxR* receptor  
29 makes *S. woodyi* non-luminescent and shut down the expression of QS genes. By coupling  
30 bacterial biosensor assays and high resolution liquid chromatography mass spectrometry  
31 (LCMS), we showed that *S. woodyi* synthesized N-octanoyl-L-homoserine lactone (C<sub>8</sub>-HSL),  
32 which can induce *S. woodyi* luminescence unlike many other of the AHLs tested. This makes  
33 it a good marine biosensor candidate for C<sub>8</sub>-HSL detection. In addition, using different  
34 approaches to study the impact of these mutations on adhesion, biofilm formation and biofilm  
35 structure, no significant difference has been detected in poor and rich media even after 240  
36 hours (10 days) of observation. This is the first study in a member of the Shewanellaceae  
37 deciphering the AHL QS system and its relationship with luminescence and biofilm  
38 formation.

39 Words : 220/250

40

## 41 **Importance**

42 While luminous bacteria are most likely very abundant in the marine environment, only few  
43 genera have been described for their bioluminescent molecular mechanisms. Luminous  
44 systems may present different characteristics worth studying if we take in consideration their  
45 importance in biotechnology applications. There is also evidence that they may provide a  
46 strong selective advantage despite their energetic cost. Most of the described bacterial  
47 luminescence has been shown to be controlled by QS. Similarly, many studies have shown  
48 that biofilm is controlled by QS. However, because QS regulation is intertwined in other  
49 networks, and that biofilm mechanisms are distinct in bacteria, relationships between QS and  
50 biofilm can be difficult to decipher in some strains. A better comprehension of these  
51 mechanisms and how they are related to each other, will help understanding how and why  
52 bacterial communities behave the way they do and therefore how to control some of their  
53 unwanted phenotypes.

54 Words: 149/150

55

## 56 Introduction

57 Quorum Sensing (QS) is a mechanism allowing bacteria to express a number of genes in  
58 coordinated manner through the secretion of small diffusible signal molecules, which above a  
59 certain threshold, trigger population-beneficial behaviors. In its simplest form, QS genes  
60 include signal synthase and response regulator sequences, the receptor for the QS molecules,  
61 which can be activated and initiates transcription of QS regulated genes in a synchronized  
62 manner. Among the signal molecules identified, have been described acylated homoserine  
63 lactones (AHLs), furanosyl-borate diesters (autoinducer-2 (AI-2)) and  $\alpha$ -hydroxyketones  
64 (cholera autoinducer-1 CAI) (1). The AHL QS system was first described in *Vibrio fischeri*,  
65 which uses the 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL to regulate its bioluminescence (1, 2). AHL QS is a widespread  
66 mechanism controlling a wide range of bacterial phenotypes (3). The *luxI* (synthase) and the  
67 *luxR* (transcriptional regulator) are often located besides each other and in *V. fischeri* the  
68 transcription of *luxI* is controlled by the LuxR proteins, which induce the AHL synthesis (1,  
69 4). The AHL QS system appears to be overall the most widely used of the QS system in the  
70 marine bacteria, although information on the prevalence of the AI-2 or CAI QS system in the  
71 marine environment are not available.

72 QS-related phenotypes can be organized in a diverse range of bacterial behaviors from  
73 bioluminescence to production of extracellular enzymes, plasmid transfer, antibiotic synthesis  
74 or biofilm formation, having significant impacts in various sectors of activities. Some of the  
75 QS regulators that directly impact biofilm structure have been identified in the most studied  
76 species, targeting flagellar based motility and attachment, maturation and dispersal of biofilm.  
77 In most of the case, high cell density triggers QS-regulated phenotypes promoting biofilm  
78 formation. However, in the case of *Vibrio cholerae* or *Staphylococcus aureus*, mutants that  
79 can mimic low cell density such as in *luxR* homolog *hapR* or in *agr* mutants form larger  
80 pellicles or biofilm than the wild-type strains with increased production of

81 exopolysaccharides or biomass, respectively (5). QS regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and  
82 other species is also subjected to changes in function of environmental conditions such as the  
83 carbon sources, the pH or physical parameters (mass transfer, surfaces...) and therefore its  
84 importance for biofilm formation can vary significantly according to the studies (5). However,  
85 in contrast with planktonic conditions where, we could assume that QS would work only in a  
86 closed system not subjected to mass transfer, biofilm conditions represents an environment  
87 that would be more propitious to a functional/beneficial QS system, as mechanisms including  
88 secretion of extracellular polysaccharides that remain to be fully characterized, could prevent  
89 direct mass transfer and contribute to retain QS secreted molecules.

90 Luminescence, which appears to be most widely spread in the marine environment, has  
91 always been described up to now as a QS controlled phenotype, which makes it a good  
92 reporter system for screening. Among the few species capable of emitting bioluminescence,  
93 different species of *vibrio* such as *V. fisheri*, *V. harveyi*, and in a lesser extent *V. campbellii*  
94 have been highly studied (6, 7). Very little information is available on bioluminescence  
95 regulation in other species. *Shewanella woodyi* has been described for the first time as  
96 luminous bacteria after being isolated from squid ink and seawater samples (8). Since then,  
97 articles have been published on the regulation of c-di-GMP synthesis and hydrolysis and its  
98 ability to form biofilm (9, 10). However, nothing is known on the implication of QS on its  
99 bioluminescence and other described QS-related phenotypes, such as biofilm formation. In  
100 this study, we have shown that *S. woodyi* MS32 *luxR* and *luxI* genes play a role in the strain  
101 luminescence. Moreover, *S. woodyi* MS32 secretes the C<sub>8</sub>-HSL molecule, which can induce *S.*  
102 *woodyi* luminescence. However, no modification of the biofilm formation or structure has  
103 been observed in our hands when comparing the mutants versus the wild-type strain or when  
104 C<sub>8</sub>-HSL was used in the media. This is the first description of the AHL QS system controlling  
105 luminescence of a member of the Shewanellaceae.

106

## 107 **Results**

### 108 ***S. woodyi* MS32 induces luminescence in a cell-density dependent manner**

109 As *S. woodyi* MS32 was described as a bioluminescent strain (8), we first wanted to  
110 characterize in which conditions this bacterium emit luminescence. *S. woodyi* MS32 was first  
111 grown planktonically in three different media: VNSS (väätänen nine salts solution) and MB  
112 (marine broth), which are both nutrient- and salt- rich media and ASW (artificial sea water),  
113 which is a poor medium, devoid of any organic carbon source. Whereas *S. woodyi* did not  
114 grow in ASW, the bacterium followed a traditional bacterial growth curve in VNSS and MB  
115 with an exponential phase between 1 and 4 hours and a post-exponential phase between 4 and  
116 7 hours (Figure 1A). Expression of *S. woodyi* luminescence in MB and VNSS media was then  
117 studied. *S. woodyi* exhibits a lag in luminescence during early and mid-exponential phases  
118 followed by a sharp increase of luminescence during the post-exponential phase, reaching a  
119 maximum at 7 hours before progressively decreasing during the stationary phase. No  
120 luminescence of the strain was observed in the poor ASW medium throughout 24 hours  
121 (Figure 1A). We also evaluated the emission of luminescence when the bacteria are cultivated  
122 in sessile conditions in microplates using the VNSS medium and different initial inoculum of  
123 *S. woodyi* MS32. In these conditions and with an initial inoculum at OD<sub>600nm</sub> of 0.3 or 0.5, we  
124 observed that luminescence slowly increases with cell density in the early stage of growth and  
125 then accelerated, with a maximal luminescence observed after 15 hours of growth, before  
126 decreasing when the bacterial growth reached a plateau (Figure 2A). Same results were  
127 obtained in sessile conditions and in MB. No luminescence was observed in ASW (data not  
128 shown).

129 Altogether, these results suggest that *S. woodyi* emits luminescence in nutrient rich media in a  
130 cell density dependent manner.

131

132 ***S. woodyi* regulates luminescence by the secretion and reception of one or**  
133 **more extracellular substances.**

134 The apparent cell density dependent luminescence of *S. woodyi* and the fact that luminescence  
135 was shown to be regulated by QS in numerous strains (11, 12) prompted us to suggest that *S.*  
136 *woodyi* luminescence is regulated by a QS mechanism involving the secretion of small  
137 diffusible signal molecules. To verify this hypothesis, a *S. woodyi* supernatant was prepared  
138 from a post-exponential phase culture in VNSS and added to 96-well white microplates  
139 containing post-exponential phase *S. woodyi* culture inoculated in VNSS at an OD<sub>600nm</sub> of 0.3.  
140 The effect of the *S. woodyi* MS32 supernatant on the luminescence was tested by measuring  
141 the luminescence intensity after 15 hours of incubation. Figure 2 shows that the luminescence  
142 of *S. woodyi* is significantly enhanced when the strain is cultivated in the presence of a  
143 supernatant of *S. woodyi* compared to the negative control, suggesting that one or more  
144 substances in the *S. woodyi* supernatant may stimulate its own luminescence. Therefore, *S.*  
145 *woodyi* MS32 regulates luminescence by the secretion and reception of one or more  
146 extracellular substances.

147

148 **Putative genes *luxR*, *luxI* and *luxCDABEG* are found in the *S. woodyi***  
149 **genome**

150 In most luminescent bacteria, the enzymes involved in bacterial luminescence are encoded in  
151 a single operon (*lux* operon) composed of five common genes, *luxCDABE*, and these are

152 found in all species of luminous bacteria (13). The *luxAB* genes encode the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits  
153 of the heterodimeric luciferase and the *luxCDE* genes encode three protein subunits of a long-  
154 chain fatty acid reductase. Genomic analysis of the *S. woodyi* MS32 sequenced genome  
155 (NC\_010506.1) revealed the presence of a putative *luxCDABE* operon (from Swoo\_3633 to  
156 Swoo\_3637) (Figure 3). Similarly to the marine luminous bacteria *Photobacterium*  
157 *phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *V. harveyi*, or *V. fischeri*, *S. woodyi* has an  
158 additional gene, *luxG*, which follows *luxE*, coding for a flavin reductase. Generally,  
159 regulatory genes, *luxI* and *luxR*, which control transcription of the *lux* operon are upstream of  
160 or flank the *luxCDABEG* genes (13). In *V. fischeri*, *luxI* is the first gene of the *lux* operon, and  
161 *luxR*, upstream of *luxI*, is divergently transcribed. In *S. woodyi* no *luxR* or *luxI* genes are  
162 located in the vicinity of the *lux* operon. However, elsewhere on the genome of *S. woodyi*, a  
163 putative *luxI* gene (Swoo\_2998) was identified and it turns out that a divergently transcribed  
164 gene encoded a putative *luxR* gene (Swoo\_2997) is also present (Figure 3). Only Swoo\_2998  
165 was identified as a putative *luxI* gene and no acyl homoserine lactone synthase from the  
166 AinS/LuxM family was found. In the genome of *S. woodyi*, three other genes were annotated  
167 as *luxR* genes (Swoo\_1991, Swoo\_4031 and Swoo\_4115). However, none of these putative  
168 *luxR* genes possess the transcription factor pfam AHL-binding region motif, pfam03472. The  
169 genome of *S. woodyi* also encodes a putative *luxS* gene but, as it is the case for all the  
170 *Shewanella* species, no *luxP/Q* or *lsr* genes were identified. It was previously suggested that  
171 AI-2 production by LuxS is not used as a quorum-sensing signal in *Shewanella* (14). Also,  
172 inspection of the intergenic region between Swoo\_2997 (*luxR* like) and Swoo\_2998 (*luxI* like)  
173 as well as the promoter region of the *lux* operon revealed the presence of a 20-base-pair  
174 inverted repeat *lux* boxes located 180 and 60 bases upstream the start site of the *lux* operon  
175 and the putative *luxI* gene, respectively (Figure 3) (11). Therefore, Swoo\_2998 (*luxI*) and

176 Swoo\_2997 (*luxR*), hereafter referred as *luxI* and *luxR*, constitute good candidates for the  
177 regulation of the *lux* operon in *S. woodyi*.

178

179 ***luxR* (Swoo\_2997) or *luxI* (Swoo\_2998) mutation makes *S. woodyi* non**  
180 **luminescent**

181 To characterize the AHL QS system putative genes found and their roles in the *S. woodyi*  
182 MS32 luminescence, we constructed two mutated strains in MS32:  $\Delta luxR$  and  $\Delta luxI$ . The  
183 effect of these two mutations on the luminescence and the expression of *lux* operon have been  
184 studied in both planktonic and sessile conditions. In these two conditions, the two mutant  
185 strains  $\Delta luxR$  or  $\Delta luxI$  have similar growth compared to the wild-type (WT) strain in VNSS  
186 (Figure 4A and B). Therefore, *luxR* or *luxI* mutations do not affect bacterial growth. As  
187 expected, no luminescence was observed throughout 24 hours in the mutant strains compared  
188 to the wild-type strain, which reaches a maximum of luminescence during the post-  
189 exponential phase after 7 and 15 hours of incubation in planktonic and sessile conditions,  
190 respectively (Figure 4A and B). These results show that *luxR* and *luxI* play a major role in the  
191 MS32 luminescence.

192

193 Moreover, in order to ascertain that expression of the QS genes was shut down in the mutant  
194 strains, the expression of *luxR*, *luxI* and *lux* operon was observed in the mutant strains using  
195 quantitative RT-PCR (Figure 5). Expression of the *luxR*, *luxI*, *luxC* and *luxD* genes of the  
196 mutant strains were compared with that of the WT strain during maximal expression of  
197 luminescence in VNSS under planktonic and sessile conditions. No expression of the  
198 luminescence genes *luxC* and *luxD* was observed in the *S. woodyi* *luxI* or *luxR* mutant strains  
199 in both conditions. This result confirms that the mutations induce the shutdown of the whole



200 QS system expression, including the downstream luminescence genes. The absence of luxI  
201 transcripts in a luxR background suggests that luxI expression is regulated by LuxR and the  
202 downregulation of luxR in a luxI background suggests the presence of a retro control loop of  
203 luxR.

204 Altogether these results showed that luxI and luxR genes are involved in the regulation of  
205 luminescence in *S. woodyi*.

206

### 207 **LuxI produces the N-octanoyl-L-Homoserine lactone (C<sub>8</sub>-HSL)**

208 A wide variety of HSL signals are produced in nature and sequence analysis of the AHL  
209 synthase family members has failed to reveal a robust correlation between amino acid  
210 sequence composition and acyl-chain length or nature of HSL substitution. Thus, to identify  
211 and characterize AHL(s) synthesis by the *S. woodyi* MS32 strain, we coupled bacterial  
212 biosensor assays and LCMS experiments. The reporter strains used were *V. harveyi* BB475,  
213 *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* A136, which are able  
214 to detect the 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL (12), the C<sub>6</sub>-HSL (15), and finally AHLs with a wider range of  
215 side chains going from C<sub>6</sub> to C<sub>14</sub>-HSL(16) some of them being hydroxylated, respectively.  
216 The sensitivity and validity of this assays were tested using negative and positive controls  
217 with each reporter strain. Addition of *S. woodyi* MS32 supernatant did not induce  
218 luminescence of the 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL biosensor BB475, whereas addition of the positive control  
219 BB120 supernatant did (Figure 6A). Therefore, *S. woodyi* MS32 does not synthesize the 3-  
220 OH-C<sub>4</sub>-HSL. The biosensor CV026, containing a deletion in the *luxI* homolog *cviI* gene, turns  
221 purple due to the synthesis of violacein when cultivated in closed proximity to the diffusible  
222 C<sub>6</sub>-HSL producer strain CV31532 on an agar plate (Figure 6b2). This same biosensor strain  
223 cultivated closed to *S. woodyi* strain did not produce any violacein (Figure 6 b3), suggesting

224 that *S. woodyi* did not produce the C<sub>6</sub>-HSL. *A. tumefaciens* A136 strain contains a *traI-lacZ*  
225 fusion allowing the detection of a wider range of side chains HSL. Cultivation of *S. woodyi*  
226 MS32 with A136 activates the expression of the *lacZ* reporter gene ascertained by the blue  
227 coloration (due to hydrolysis of X-Gal) produced by A136 (Figure 6 a3), which suggests that  
228 MS32 synthesizes one or more AHL(s) with longer side chains (> 6 carbon atoms).  
229 Conversely, the  $\Delta luxI$  strain does not stimulate gene expression of A136, which confirms that  
230 LuxI is an AHL synthase (Figure 6 a5). No coloration was also observed in the case of the  
231  $\Delta luxR$  strain (Figure 6 a4) suggesting the presence of a positive feedback circuit controlling  
232 *luxI* expression and hence AHL production.

233  
234 In order to identify the AHL molecule(s) synthesized by MS32, a LCMS analysis was  
235 performed using an extraction of *S. woodyi* MS32 and standard AHL molecules listed in the  
236 Table 2. The AHLs were injected into the chromatographic column in the form of a three  
237 mixes (unsubstituted, hydroxy- and oxo-AHLs mixes), whose retention times and the  
238 precursor ion  $[M + H]^+$  obtained for each molecule are noted in the Table 2. Based on the  
239 retention times, the precursor ion characteristic of each AHL molecule and the  $m/z \sim 102$  ion  
240 characteristic of the lactone ring, it has been found that *S. woodyi* MS32 synthesizes one  
241 molecule of AHL, which is the C<sub>8</sub>-HSL (Figure 7).

242

### 243 **Only C<sub>8</sub>-AHL can induce the *S. woodyi* luminescence**

244 To test the LuxR ability to bind exogenous AHLs and to identify its specificity against C<sub>8</sub>-  
245 HSL synthesized by *S. woodyi* and other AHLs molecules, a luminescence stimulation and  
246 induction tests were performed on *S. woodyi* MS32 and  $\Delta luxI$  respectively, using the various  
247 AHLs molecules cited in the Table 2. The figure 8A shows the luminescence of *S. woodyi*  
248 MS32 with and without addition of exogenous AHLs. The results show that except C<sub>8</sub>-HSL,

249 which significantly stimulates the luminescence, no other AHL molecule among the AHLs  
250 tested can induce luminescence of MS32. The C<sub>8</sub>-HSL stimulatory effect on the MS32  
251 luminescence was studied for 24 hours (Figure 8B). The result shows that the difference in the  
252 luminescence emission between the control samples (without AHL and in the presence of  
253 DMSO) and *S. woodyi* MS32 in the presence of C<sub>8</sub>-HSL was maximal at 15 hours. When the  
254 same AHLs are tested with  $\Delta luxI$  (Figure 8C), only C<sub>8</sub>-HSL induces luminescence. Therefore,  
255 LuxR shares a limited specificity where it can only bind the C<sub>8</sub>-HSL.

256 Finally, the dose dependent response was studied using the *S. woodyi*  $\Delta luxI$  strain with several  
257 concentrations of C<sub>8</sub>-AHL. The luminescence of MS32 increases with the raise of the C<sub>8</sub>-  
258 AHL concentration from 1  $\mu$ M to 50  $\mu$ M to reach a plateau after 50  $\mu$ M (Figure 8D) probably  
259 due to the saturation of the LuxR receptor. Therefore, C<sub>8</sub>-AHL controls the luminescence of  
260 *S. woodyi* in a dose dependent manner.

261

## 262 **AHL QS system of *S. woodyi* is not involved in adhesion and biofilm** 263 **formation**

264 In some species, quorum sensing coordinates the expression of several unlinked genetic loci  
265 and several authors have reported the AHL QS system involvement in the adhesion and  
266 biofilm formation in Gram negative bacteria (17, 18). To verify whether *S. woodyi* QS system  
267 is involved in biofilm formation in addition to luminescence production, adhesion and biofilm  
268 formation assays either in VNSS, MB or ASW were performed using the WT and mutant  
269 strains. No significant difference in the adhesion (Figure 9A) and biofilm formation (Figure  
270 9B) were observed between the *S. woodyi* MS32 and its mutant strains in the three media.  
271 Note that similarly to *Shewanella fridgidimarina* NCIMB400 (19), while *S. woodyi* MS32 is  
272 not able to grow planktonically in ASW, the bacterium is able to form more biofilm in this

273 medium than in the rich media VNSS and MB. In parallel, a biofilm staining of *S. woodyi*  
274 MS32,  $\Delta luxR$  and  $\Delta luxI$  in VNSS, MB and ASW was performed using SYTO9 in order to  
275 observe the biofilm structuration at different time points (24, 48, 72 and 240 hours). No  
276 significant difference was observed in the biofilm structure of the *S. woodyi* MS32 versus  
277  $\Delta luxR$  or  $\Delta luxI$  strains in the different culture media (data not shown). Consequently, AHL  
278 QS system mutation of *S. woodyi* has no effect on its adhesion and biofilm formation.

279 The effect of exogenous AHLs were also tested on the adhesion and biofilm formation of the  
280 *S. woodyi* MS32 and  $\Delta luxI$  strains. While only C<sub>8</sub>-HSL can stimulate luminescence of these  
281 two strains, here no AHL including C<sub>8</sub>-AHL can significantly modify the adhesion (Figure 9C  
282 and D) and biofilm formation (Figure 9E and F) of *S. woodyi* MS32 and  $\Delta luxI$  strains.  
283 Therefore, AHL QS system of *S. woodyi* regulates the bioluminescence and does not seem to  
284 be involved in adhesion and biofilm formation.

285

## 286 **DISCUSSION**

287 More than 30 luminous systems have been described up to now with diverse  
288 associations of luciferins, enzymes, co-factors. Regarding bacteria, although most of them  
289 need to be uncovered, very few genera has been described for their bioluminescent properties  
290 in terms of chemistry and molecular mechanisms (7). Among these few genera described,  
291 while bacteria are mostly composed of 2 subunits encoded by *luxA* and *luxB* genes,  
292 differences in the luminescence emission have been described such as luminescence intensity  
293 or light decay. In addition, marine genera (*Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* and  
294 *Vibrio*), which comprise bioluminescence species, include also many closely related  
295 nonluminous species (20). While *lux* sequences share a high percentage of identity in  
296 luminescent bacteria in particular in *Vibrio* genus, the bacteria are coming from diverse

297 environments, which suggests that this property provides a strong selective advantage despite  
298 the energetic cost. In most organisms, QS helps regulating the emission of light in  
299 luminescent bacteria in order for them to not produce their light producing molecules unless  
300 the quorum is reached (20). Different parameters can also affect light emission such as  
301 substrates (aldehydes...), factors (diphosphopyridine nucleotide, concentration in salts...) as  
302 well as metals (copper, zinc, mercury....) or pH (7). Therefore, these luminous systems  
303 present some differences that are worth studying if we take in consideration their importance  
304 in many biotechnology applications. Understanding the mechanism of bacterial luminescence  
305 and studying how the regulation is operated should give information of the conservation and  
306 the importance of these mechanisms among luminous bacteria.

307         QS regulatory networks have been shown in the past decades to be entangled between  
308 themselves and with other regulatory network such as cyclic-3'5'-diguanylic acid (c-di-GMP)  
309 and small RNAs regulation. In addition, biofilm formation mechanisms, which are in many  
310 cases controlled by QS, are distinct between different bacterial species and are therefore also  
311 directly or indirectly regulated by these above regulatory networks. In *Pseudomonas*  
312 *aeruginosa* for example, biofilm formation and in particular *psl* exopolysaccharide expression  
313 is regulated by a network implying the two quorum sensing systems Las and Rhl, the c-di-  
314 GMP pathway as well as the Gac/Rsm signaling cascade (21-23). Therefore, QS is not likely  
315 to play the only role in some phenotypes regulation and a good knowledge of the regulatory  
316 networks that are possibly connected to it, is necessary.

317

318         Despite this high complexity, in most of the published studies, QS have been shown to  
319 modulate biofilm formation in many bacterial strains. Even with *P. aeruginosa* for which it  
320 was thought at some stage that a good proportion of bacteria during chronic infection were  
321 submitted to hypermutation and phenotypic alteration events, it appears that genes involved in

322 biofilm development and persistence were positively regulated by QS. Indeed, QS-deficient  
323 mutants of *P. aeruginosa* ( $\Delta lasR\Delta rhlR$  and  $\Delta lasI\Delta rhlI$  mutants) can form thinner and smaller  
324 biofilm. In addition, *rhl* system and the C<sub>4</sub>-HSL were fully present at the end of the chronic  
325 stages coinciding with overproduction of alginate and rhamnolipids. This latter component  
326 has a role in maintaining biofilm architecture in particular in the internal cavities allowing  
327 proper flow of water and nutrients (reviewed in(24)). Therefore, biofilms, which are a sum of  
328 many complex sub-phenotypes (adhesion, secretion of compounds, dispersion...) controlled  
329 by different mechanisms, need to be evaluated independently through their sub-phenotypes in  
330 order to better understand how they play a role in biofilm formation and how they are  
331 regulated in diverse bacteria. In this paper, we have demonstrated for the first time in a  
332 member of the Shewanellaceae that *S. woodyi* MS32 emits luminescence in its rich growing  
333 media in planktonic as well as in sessile conditions, and that both *luxR* and *luxI* genes play a  
334 role in the strain luminescence. We also have shown that LuxI secretes a C<sub>8</sub>-HSL, which can  
335 induce *S. woodyi* luminescence. Since none of the other AHLs tested are able to significantly  
336 modulate luminescence, this makes it a good marine biosensor candidate to detect C<sub>8</sub>-HSL.  
337 However, using different approaches to study the impact of these mutations on adhesion,  
338 biofilm formation and biofilm structure, no significant difference have been detected in poor  
339 and rich media even after 240 hours (10 days) of observation. It is possible that other sub-  
340 phenotypic events of biofilm formation such as the production of certain molecules in the  
341 biofilm matrix, or the dispersion at later stage could be controlled by QS. In addition,  
342 although we tested biofilm formation in different media, it is possible that other external  
343 factors could mask differences between the mutant and the wild-type strains initial attachment  
344 or biofilm structure. Biofilm formation and its associated sub-phenotypes may be regulated by  
345 a fine tuned equilibrium between several regulatory networks intertwined or entrapped with

346 each other, which may also be highly subjected to environmental conditions. It may also be  
347 possible that in some species, biofilm formation is not regulated by QS.

348

349 In conclusion, in the marine environment, QS communication system is more likely to  
350 occur within microbial communities than with planktonic singular entities (1). Biofilms are  
351 the preferred life style for bacteria as they can find nutrients and protection from adverse  
352 environmental conditions. However, because QS regulatory networks are intertwined between  
353 themselves and with other regulatory networks, and that biofilm formation mechanisms are  
354 distinct between different bacterial species, it is not surprising that the relationship between  
355 QS and biofilm formation can be difficult to decipher in some strains. Environmental factors  
356 can also modify the regulation of both QS system and biofilm formation independently of one  
357 another (25). A better comprehension of these mechanisms and how they are related to each  
358 other, will help in many ways understanding how and why bacteria and their communities  
359 behave the way they do and therefore how to control some of their unwanted phenotypes. For  
360 instance, one of the fundamental issue concerns the research of small molecules to be  
361 screened for quorum sensing inhibitory activities. Due to the diversity of the mechanisms  
362 controlled by QS or similar regulatory networks, cocktails of molecules with diversified  
363 targets might be necessary for controlling them at least in open environment like the marine  
364 environments. In addition, when large libraries of molecules are screened on a specific  
365 phenotype, one cannot rule out that they may have other unknown effects as the molecular  
366 mechanisms behind their activities have often not been deciphered. Molecules that are  
367 specifically targeting QS components may present more efficient and specific activities.  
368 Therefore, there is a need for fundamental studies on the molecular mechanisms of regulatory  
369 networks such as quorum sensing, and their potential interactions with small molecules,

370 which should help in rationally designing the next generation of compounds for a better  
371 efficacy.

372

## 373 **Materials and methods**

### 374 **Bacterial strains and culture conditions**

375 Strains used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* WM3064 strain was grown in  
376 LB medium (Thermo Fisher) complemented with 2,3-diaminopropionic acid (DAP, 100 µM,  
377 Sigma Aldrich) at 37°C with shaking (250 rpm). *Vibrio harveyi* strains were grown at 30°C  
378 with shaking (170 rpm) in marine broth (MB) medium (Difco). *Agrobacterium tumefaciens*  
379 and *Chromobacterium violaceum* strains were cultivated in LB. The *Shewanella woodyi*  
380 MS32 wild-type (WT) strain (8), and its derivatives were grown in Vääänen nine salt  
381 solution (VNSS) (26), Artificial Sea Water (ASW), MB or MB/LB (10 g/l LB, 14 g/l MB)  
382 media at 20°C with shaking (120 rpm). Antibiotics were added at the following  
383 concentrations: 25 µg/ml spectinomycin (*A. tumefaciens* A136), 2 µg/ml of tetracycline (*A.*  
384 *tumefaciens* A136), 100 µg/ml kanamycin (*V. harveyi* BB475 and *S. woodyi* transconjugants)  
385 and 25µg/ml of ampicillin (*S. woodyi* transconjugants).

### 386 **Construction of *luxI* and *luxR* mutant strains**

387 Genomic DNA extraction and purification of *S. woodyi* MS32 was performed using the  
388 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Polymerase chain reaction (PCR) was used to  
389 amplify regions of genomic DNA flanking the *luxR* and *luxI* genes (Swoo\_2297 and  
390 Swoo\_2998) using hotstar hifidelity polymerase (QIAGEN) and the primers listed in Table 1.  
391 Upstream and downstream flanking fragments were cloned into the ApaI and SpeI restriction  
392 sites of suicide vector pSMV3. A BamHI restriction site was added between the upstream and



393 downstream fragments to facilitate cloning. The resulting vectors p $\Delta$ luxR and p $\Delta$ luxI (Table  
394 1) were introduced in *S. woodyi* MS32 by conjugation with *E. coli* WM3064 with the  
395 following protocol. Mid-exponential phase cultures of WM3064 p $\Delta$ luxR or p $\Delta$ luxI were  
396 mated with post-exponential phase *S. woodyi* MS32 in a 1:3 ratio on MB/LB plates containing  
397 100  $\mu$ M DAP for 2 days at 25°C. *S. woodyi* transconjugants were selected on MB/LB DAP  
398 free agar plates containing 100  $\mu$ g/ml kanamycin and 25 $\mu$ g/ml ampicillin (*S. woodyi* is an  
399 ampicillin resistant strain. Ampicillin was used to eliminate all strains of *E. coli* WM3064).  
400 Few clones were then streaked on MB/LB agar plates with 5% sucrose at 20°C to select for  
401 double-recombination events. Sucrose resistant clones sensitive to kanamycin were screened  
402 by PCR for gene deletion.

### 403 **Monitoring of *S. woodyi* MS32 growth and luminescence**

404 The growth and luminescence of *S. woodyi* were monitored under planktonic or sessile  
405 conditions and in different media (VNSS, ASW and MB). For planktonic conditions  
406 monitoring, *S. woodyi* strains were subcultured to an OD<sub>600</sub> of 0.1 and grown in Erlenmeyer  
407 flasks at 20°C with shaking (120 rpm). To monitor luminescence in sessile conditions, post-  
408 exponential phase of *S. woodyi* strains were diluted to obtain the required OD<sub>600</sub> (0.01, 0.1,  
409 0.3 or 0.5) and added to 96-well white and transparent microplates (200  $\mu$ l/well). The  
410 microplates were then incubated at 20°C and 120 rpm. When necessary, various AHL at  
411 concentrations indicated in the text or in the figures legend were added. For experiments  
412 requiring ASW, overnight cultures in VNSS were used. Optical density and luminescence  
413 were measured using a Genesys 20 spectrophotometer (Thermo Fisher scientific) and  
414 Tecan200 microplates reader (Infinite M 200 pro) respectively.

### 415 **RT-qPCR**

416 Planktonic cultures of *S. woodyi* strains were collected after 7 hours of incubation in  
417 Erlenmeyer flasks at 20°C with shaking while sessile cultures were obtained after 15h of  
418 incubation at 20°C in 24-well microplates (1 ml/well). RNAs were extracted and purified  
419 using the Maxwell® kit (Promega Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification kit) and  
420 reverse transcription was performed with a SuperScript master mix (Invitrogen). Real  
421 time quantitative PCR was done in triplicate using a SybrGreen Master mix (Thermo Fisher)  
422 and an ABI 7500 qPCR apparatus (Applied Biosystems). Primers used for each gene are  
423 listed in Table 1. The 16S RNA gene was used as a positive control. Only single peaks were  
424 observed in the dissociation curves for both the samples and 16S RNA control, indicating a  
425 specific amplification with each set of primers. Genomic DNA was used as a standard and the  
426 transcript levels of all genes were normalized to total cDNA.

#### 427 **AHL assay**

428 The screening of AHLs synthesized by *S. woodyi* was performed using 3 types of biosensor  
429 bacteria listed in Table 1. *S. woodyi* supernatants were prepared from post-exponential phase  
430 cultures in MB after 6 hours of incubation at 20°C and 120 rpm, followed by centrifugation  
431 for 10 min at 6000 rpm and filtration (0.22 µm pore size). Then, 10% v/v of the supernatant  
432 was added in triplicate into 96-well white microplates containing a 1/5000 dilution (in MB  
433 supplemented with 100 µg/ml of kanamycin) of BB475 overnight culture (27). The  
434 luminescence was measured after 24 hours of incubation at 30°C using the TECAN  
435 microplate reader. The supernatant of *V. harveyi* WT (BB120) collected after 7 hours of  
436 incubation at 30°C (corresponding to the maximum expression of bioluminescence) and  
437 diluted to 10% v/v, was used as positive control (27).

438 *S. woodyi* MS32 and the *Agrobacterium* or *Chromobacterium* biosensors (Table 1) were  
439 streaked 0.5 cm apart from each other ('T streak' shape) on a VNSS agar plate supplemented

440 for A136 with 40 µg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal), 25 µg/ml of  
441 spectinomycin and 2 µg/ml of tetracycline. Plates were incubated for 48h at 20°C (28).

#### 442 **LC-MS analysis**

443 AHL extraction of the *S. woodyi* MS32 WT strain was performed according to the protocol  
444 described elsewhere (28). Briefly, 50 ml of MS32 WT post-exponential (7 hours of incubation  
445 at 20°C and 120 rpm) culture were centrifuged at 3000 g for 10 min and at 4°C. Culture  
446 supernatants were extracted three times with dichloromethane (1:1, v/v). The organic phase  
447 was dried with the addition of anhydrous magnesium sulfate (OSI), then filtered and  
448 evaporated under reduced pressure at 40°C. The dry extract obtained was dissolved in 1 ml  
449 methanol (VWR; HPLC grade) and stored at -20°C until use. Three types of standard AHL  
450 solution mixes (Table 2) grouped according to their substitution (Unsubstituted AHLs, OH-  
451 AHLs and O-AHLs) were prepared by combining in each mix 200 µl of five commercial  
452 AHL molecules (Sigma Aldrich), solubilized in methanol (VWR; HPLC grade) at a  
453 concentration of 1 mg/ml. The presence of AHLs in the *S. woodyi* MS32 WT extraction was  
454 deduced by LC/MS analysis as described by Aye *et al.* (29). AHLs were detected on the  
455 extracted ion chromatogram by monitoring the retention time (RT) and the [M+H]<sup>+</sup> precursor  
456 ion characteristic of each AHL molecule using the data analysis 4.3 software (Bruker). The  
457 presence of AHL has been verified using the characteristic fragment ion at m/z 102 derived  
458 from HSL moiety.

#### 459 **Adhesion and biofilm formation assays**

460 The adhesion assays were performed in 96-well polystyrene microplates as previously  
461 described (29) with few modifications. Post-exponential phase of *S. woodyi* WT or  $\Delta luxI$   
462 subcultures in VNSS were centrifuged and resuspended in ASW to reach an OD<sub>600</sub> of 0.3.  
463 Then, the bacterial suspension was inoculated in 96-well microplates with or without addition

464 of 10% (v/v) AHL at 25  $\mu$ M. After 15 hours of incubation at 20°C, non-adhered bacteria were  
465 removed by washing three times with a sterile 36 g/l NaCl solution and the adhered bacteria  
466 were stained with fluorescent DNA-binding dye SYTO9 at 1  $\mu$ M. After 20 minutes of  
467 incubation, the SYTO9 was removed with the NaCl wash solution and fluorescence intensity  
468 (FI) was measured with a Tecan microplate reader with an excitation at 475 nm and an  
469 emission at 510 nm according to supplier's recommendations. The data are reported as the FI  
470 of bacterial strain subtracted from FI of sterile media with 10% (v/v) AHL and divided by FI  
471 of the sterile media which were used as controls into a plate and treated in the same manner as  
472 wells containing bacteria.

473 The evolution of biofilm formation was analyzed using the Crystal Violet (CV) assay  
474 following the protocol of Liu *et al.* (10) with some modifications. Post-exponential phase *S.*  
475 *woodyi* WT or  $\Delta luxI$  subcultures in VNSS were centrifuged and resuspended in ASW to reach  
476 an OD<sub>600</sub> of 0.5. The bacterial suspension was then inoculated in 96-well microplates with or  
477 without addition of 10% (v/v) AHL at 25  $\mu$ M. After 48 hours of incubation at 20°C, the  
478 planktonic cells and media were removed, and the bacteria were washed twice with 100 $\mu$ l of  
479 distilled water to remove remaining non-adherent bacteria. Biofilm formation staining was  
480 then performed with 200  $\mu$ L of 0.1% (w/v) CV in distilled water for 15 min. Microplates  
481 wells were then rinsed three times with 200  $\mu$ l distilled water, followed by 15 min at room  
482 temperature. To release the CV adsorbed by the biofilm cells, a solubilization step was  
483 performed by addition of 100  $\mu$ l DMSO per well followed with an agitation of 5 minutes at  
484 120 rpm. Then, the solution containing DMSO and solubilized CV was transferred from the  
485 microplate into another sterile 96-well microplate and the OD of each well was measured at  
486 570 nm (OD<sub>570</sub>) using a Tecan microplate reader. The data are reported as the CV absorbance  
487 at 570 nm of bacterial samples subtracted from CV absorbance of the sterile media containing

488 10% (v/v) AHL and divided by CV absorbance of the sterile media which were used as  
489 controls into a microplate and treated in the same manner as wells containing bacteria.

490 To evaluate the effect of *luxR* or *luxI* mutations on the thickness and the structure of biofilm  
491 formed by *S. woodyi*, biofilm formation at 24, 48, 72 and 240 hours in VNSS, MB and ASW  
492 was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using the SYTO9 staining.  
493 Post-exponential phase *S. woodyi* WT or  $\Delta luxI$  or  $\Delta luxR$  subcultures in VNSS or MB were  
494 diluted to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.5 and added to 24-well microplates (1ml/well) containing a  
495 circular cover glass. In the case of ASW, post-exponential phase subcultures in VNSS were  
496 centrifuged and resuspended in ASW to reach an OD<sub>600</sub> of 0.5 and likewise added to 24-well  
497 microplates. After 24, 48, 72 and 240 hours of incubation without shaking at 20°C, the media  
498 were removed, and the bacteria were washed twice with 1 ml of sterile media to remove the  
499 remaining non-adherent bacteria. The adhered bacteria were then fixed on the cover slip by  
500 adding a 3.7% formaldehyde solution. After 30 min of incubation at room temperature, cover  
501 slips were rinsed three times with phosphate-buffered Saline (PBS) solution and stained with  
502 1.5  $\mu$ M of SYTO9 for 15 min in the dark. Samples were mounted using a Diamond Prolong  
503 Antifade reagent (Thermo Fisher). Microscopy images were recorded with a CLSM Zeiss  
504 LSM 510 at 5 different locations of each cover slip.

## 505 **Statistical analyses**

506 Statistical analysis was done via GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA,  
507 USA) using t-test, one-way and two-way ANOVA tests. Statistical significance was accepted  
508 from  $P_{\text{value}} < 0.05$  obtained using Bonferroni or Tukey multiple comparison post-tests.

509

## 510 **Acknowledgments**

511 Mahmoud Hayek is the beneficial of Libanese grants from the Association of Specialization  
512 and Scientific Guidance (ASSG). We thank Yoan Ferandin for advisory help in qPCR, and  
513 the EMBRC network for funding.

514

## 515 **References**

516

- 517 1. Hmelo LR. 2017. Quorum Sensing in Marine Microbial Environments. *Ann Rev Mar Sci*  
518 9:257-281.
- 519 2. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. 1981.  
520 Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*  
521 20:2444-9.
- 522 3. Khajanchi BK, Sha J, Kozlova EV, Erova TE, Suarez G, Sierra JC, Popov VL, Horneman AJ,  
523 Chopra AK. 2009. N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type  
524 VI secretion system, biofilm formation, protease production, and *in vivo* virulence in a clinical  
525 isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* 155:3518-3531.
- 526 4. Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu*  
527 *Rev Cell Dev Biol* 21:319-46.
- 528 5. Passos da Silva D, Schofield MC, Parsek MR, Tseng BS. 2017. An Update on the  
529 Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. *Pathogens* 6.
- 530 6. Kita-Tsukamoto K, Yao K, Kamiya A, Yoshizawa S, Uchiyama N, Kogure K, Wada M. 2006.  
531 Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene  
532 restriction analysis. *FEMS Microbiol Lett* 256:298-303.
- 533 7. Sharifian S, Homaei A, Hemmati R, Khajeh K. 2017. Light emission miracle in the sea and  
534 preeminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology. *J Photochem*  
535 *Photobiol B* 172:115-128.

- 536 8. Makemson JC, Fulayfil NR, Landry W, Van Ert LM, Wimpee CF, Widder EA, Case JF. 1997.  
537 *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the  
538 Alboran Sea. Int J Syst Bacteriol 47:1034-9.
- 539 9. Liu N, Pak T, Boon EM. 2010. Characterization of a diguanylate cyclase from *Shewanella*  
540 *woodyi* with cyclase and phosphodiesterase activities. Mol Biosyst 6:1561-1564.
- 541 10. Liu N, Xu Y, Hossain S, Huang N, Coursolle D, Gralnick JA, Boon EM. 2012. Nitric Oxide  
542 Regulation of Cyclic di-GMP Synthesis and Hydrolysis in *Shewanella woodyi*. Biochemistry  
543 51:2087-2099.
- 544 11. Antunes LC, Schaefer AL, Ferreira RB, Qin N, Stevens AM, Ruby EG, Greenberg EP. 2007.  
545 Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. J Bacteriol 189:8387-91.
- 546 12. Ke X, Miller LC, Bassler BL. 2015. Determinants governing ligand specificity of the *Vibrio*  
547 *harveyi* LuxN quorum-sensing receptor. Mol Microbiol 95:127-42.
- 548 13. Dunlap P. 2014. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. Adv Biochem Eng  
549 Biotechnol 144:37-64.
- 550 14. Learman DR, Yi H, Brown SD, Martin SL, Geesey GG, Stevens AM, Hochella MF, Jr. 2009.  
551 Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in biofilm development and sulfur  
552 metabolism. Appl Environ Microbiol 75:1301-7.
- 553 15. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH,  
554 Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium*  
555 *violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-  
556 acylhomoserine lactones. Microbiology 143 ( Pt 12):3703-11.
- 557 16. Zhu J, Beaver JW, More MI, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC. 1998. Analogs of the  
558 autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of  
559 *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 180:5398-405.
- 560 17. Liu J, Fu K, Wang Y, Wu C, Li F, Shi L, Ge Y, Zhou L. 2017. Detection of Diverse N-Acyl-  
561 Homoserine Lactones in *Vibrio alginolyticus* and Regulation of Biofilm Formation by N-(3-  
562 Oxodecanoyl) Homoserine Lactone *In vitro*. Front Microbiol 8:1097.

- 563 18. Tseng BS, Majerczyk CD, Passos da Silva D, Chandler JR, Greenberg EP, Parsek MR. 2016.  
564 Quorum Sensing Influences *Burkholderia thailandensis* Biofilm Development and Matrix  
565 Production. *J Bacteriol* 198:2643-50.
- 566 19. Linares D, Jean N, Van Overtvelt P, Ouidir T, Hardouin J, Blache Y, Molmeret M. 2016. The  
567 marine bacteria *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 upregulates the type VI secretion  
568 system during early biofilm formation. *Environ Microbiol Rep* 8:110-21.
- 569 20. Widder EA. 2010. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and  
570 ecological diversity. *Science* 328:704-8.
- 571 21. Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS. 2012. The FleQ protein from  
572 *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene  
573 expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*  
574 40:7207-18.
- 575 22. Fata Moradali M, Donati I, Sims IM, Ghods S, Rehm BH. 2015. Alginate Polymerization and  
576 Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 6:e00453-15.
- 577 23. Wang Y, Hay ID, Rehman ZU, Rehm BH. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-  
578 dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*  
579 *Biotechnol* 99:7253-65.
- 580 24. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for  
581 Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39.
- 582 25. Hooshangi S, Bentley WE. 2008. From unicellular properties to multicellular behavior:  
583 bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr Opin Biotechnol* 19:550-5.
- 584 26. Eguchi M, Nishikawa T, Macdonald K, Cavicchioli R, Gottschal JC, Kjelleberg S. 1996.  
585 Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium  
586 *Shingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* 62:1287-94.
- 587 27. Surette MG, Bassler BL. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*  
588 *typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7046-50.
- 589 28. Aye M, Bonnin-Jusserand M, Brian-Jaisson F, Ortalo-Magne A, Culioli G, Koffi Nevry R,  
590 Rabah N, Blache Y, Molmeret M. 2015. Modulation of violacein production and phenotypes



- 591 associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the  
592 marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Microbiology 161:2039-51.
- 593 29. Mireille Aye A, Bonnin-Jusserand M, Brian-Jaisson F, Ortalo-Magne A, Culioli G, Koffi  
594 Nevry R, Rabah N, Blache Y, Molmeret M. 2015. Modulation of violacein production and  
595 phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones  
596 in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Microbiology 161:2039-51.
- 597 30. Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM. 1997. Cross-species induction of luminescence in the  
598 quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. J Bacteriol 179:4043-5.
- 599 31. Bassler BL, Wright M, Silverman MR. 1994. Multiple signalling systems controlling  
600 expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a  
601 second sensory pathway. Mol Microbiol 13:273-86.
- 602
- 603
- 604

605 **Tables**

606 **Table 1. Strains, plasmids and primers used in this work**

|                                  |                    | Characteristics                                                                                                                       | References |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Bacterial Strains</b>         |                    |                                                                                                                                       |            |
| <i>Shewanella woodyi</i>         | MS32, ATCC 51908   | Wild-type strain                                                                                                                      | (8)        |
|                                  | MS32 $\Delta luxI$ | Mutant of the AHL synthase gene                                                                                                       | this study |
|                                  | MS32 $\Delta luxR$ | Mutant of the AHL receptor gene                                                                                                       | this study |
| <i>Vibrio harveyi</i>            | BB120              | Wild type strain, synthesizes the 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL                                                                            | (30)       |
|                                  | BB475              | Reporter <i>luxM</i> and <i>luxPQ</i> mutant strain                                                                                   | (31)       |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | CV31532            | Wild-type strain, synthesizes the C <sub>6</sub> -HSL                                                                                 | (15)       |
|                                  | CV026              | Reporter <i>civI::Tn5</i> mutant strain                                                                                               | (15)       |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | KYC6               | Wild type strain, synthesizes the C <sub>8</sub> -HSL                                                                                 | (16)       |
|                                  | A136               | Reporter <i>traI</i> mutant strain, carrying pCF218 containing a <i>tetR-traR</i> fusion, pCF372 containing a <i>traI-lacZ</i> fusion | (16)       |
| <i>Escherichia coli</i>          | WM3064             | Donor strain for conjugation, DAP auxotroph                                                                                           | (10)       |
| <b>Plasmids</b>                  |                    |                                                                                                                                       |            |
| pSMV3                            | pSMV3              | Mobilizable suicide vector, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>sacB</i>                                                                       | (10)       |
|                                  | p $\Delta luxR$    | pSMV3 with deleted <i>luxR</i>                                                                                                        | this study |
|                                  | p $\Delta luxI$    | pSMV3 with deleted <i>luxI</i>                                                                                                        | this study |
| <b>Primers</b>                   |                    |                                                                                                                                       |            |
| Deletion primers                 | <i>luxR</i> -EA    | <u>GGGCCC</u> GATGTCAATGTAGTCGCCATCATG                                                                                                | this study |

|                 |                   |                                        |            |
|-----------------|-------------------|----------------------------------------|------------|
|                 | <i>luxR</i> -IA   | <u>GGATCCTGCAGAATAGAGCTCAGGCGATTG</u>  | this study |
|                 | <i>luxR</i> -EB   | <u>ACTAGT</u> GGCTGGTGTCACTACCATGTAGAC | this study |
|                 | <i>luxR</i> -IB   | <u>GGATCCTCTCATCAGAAGATGAGGATGAGC</u>  | this study |
|                 | <i>luxI</i> -EA   | <u>GGGCCC</u> AGTATCTCACTCTCCCTTCCGGTC | this study |
|                 | <i>luxI</i> -IA   | <u>GGATCCTCTGTTGAGTCGTTGGATTGTGTG</u>  | this study |
|                 | <i>luxI</i> -EB   | <u>ACTAGTTGCAAGACTGGTACGAGATTGATG</u>  | this study |
|                 | <i>luxI</i> -IB   | GGATCCATCTTCAATCAACTACTGCCAGAC         | this study |
| RT-QPCR primers | <i>luxR</i> -up   | AAGCGTTTCATTGCCTGTGC                   | this study |
|                 | <i>luxR</i> -down | GCTCTGCATCCTTCAGACGA                   | this study |
|                 | <i>luxI</i> -up   | ACACCAGCCACTAGAGTCGT                   | this study |
|                 | <i>luxI</i> -down | TTTGGTGCGTCTTTTCGATGG                  | this study |
|                 | <i>luxC</i> -up   | GGCGATAAAACACACTCCGC                   | this study |
|                 | <i>luxC</i> -down | ACGCTTTGTGTGGAGAAGCA                   | this study |
|                 | <i>luxD</i> -up   | GCCTATGATGTCGCCAACGA                   | this study |
|                 | <i>luxD</i> -down | TGGTTGAGTTGAAGGTGTCCC                  | this study |
|                 | 16S-up            | AATACCGCATAACGCCCTACG                  | this study |
|                 | 16S-down          | CATGGCTGCATCAGGCTTTC                   | this study |

---

608

609 **Table 2. AHL mixes used in this work, their retention times and precursor ions of AHLs used in LCMS**

| AHL Mixes          | AHL molecules             | Molecules Full Name                   | Molar mass (g/mol) | RT (min) | [M + H] <sup>+</sup> |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------|----------|----------------------|
| Unsubstituted AHLs | C <sub>6</sub> -HSL       | N-Hexanoyl-L-homoserine lactone (HSL) | 199.25             | 22.7     | 199.8                |
|                    | C <sub>8</sub> -HSL       | N-Octanoyl-DL-HSL                     | 227.30             | 29       | 227.87               |
|                    | C <sub>10</sub> -HSL      | N-decanoyl-L-HSL                      | 255.35             | 33.5     | 255.92               |
|                    | C <sub>12</sub> -HSL      | N-Dodecanoyl-DL-HSL                   | 283.41             | 37.6     | 284                  |
|                    | C <sub>14</sub> -HSL      | N-Tetradecanoyl-DL-HSL                | 311.46             | 41.6     | 312.05               |
| OH-AHLs            | 3-OH-C <sub>4</sub> -HSL  | (3-Hydroxybutyryl)-L-HSL              | 187,19             | nd*      | nd                   |
|                    | 3-OH-C <sub>8</sub> -HSL  | (3-Hydroxyoctanoyl)-DL-HSL            | 243,3              | 23.5     | 243.88               |
|                    | 3-OH-C <sub>10</sub> -HSL | (3-Hydroxydecanoyl)-DL-HSL            | 271,35             | 28.6     | 271.95               |
|                    | 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL | (3-Hydroxydodecanoyl)-DL-HSL          | 299,41             | 32.8     | 299.99               |
|                    | 3-OH-C <sub>14</sub> -HSL | (3-Hydroxytetradecanoyl)-DL-HSL       | 327.46             | 36.9     | 328.05               |
| O-AHLs             | 3-O-C <sub>6</sub> -HSL   | (β-Ketocaproyl)-L-HSL                 | 213,23             | 15.7     | 214.08               |
|                    | 3-O-C <sub>8</sub> -HSL   | (3-Oxo-octanoyl)-L-HSL                | 241,28             | 23.8     | 241.86               |
|                    | 3-O-C <sub>10</sub> -HSL  | (3-Oxodecanoyl)-L-HSL                 | 269,34             | 30.2     | 269.93               |
|                    | 3-O-C <sub>12</sub> -HSL  | (3-Oxododecanoyl)-L-HSL               | 297,39             | 34.4     | 298.00               |
|                    | 3-O-C <sub>14</sub> -HSL  | (3-Oxotetradecanoyl)-L-HSL            | 325.44             | 38.3     | 326.04               |

610 \*nd: not done

611

612

## 613 **Figures legends**

614 **Figure 1. *S. woodyi* MS32 luminescence is directly correlated with its growth and**  
615 **reaches a peak during the post-exponential phase.** A. *S. woodyi* was subcultured in VNSS,  
616 MB or ASW at an OD600 of 0.1 and incubated at 20°C. Optical density and luminescence  
617 were measured using spectrophotometer and Tecan200 respectively. B. Post-exponential  
618 cultures of *S. woodyi* MS32 in VNSS obtained from an initial inoculum prepared at an  
619 OD600 of 0.01, 0.1, 0.3 or 0.5 were inoculated into 96-well white microplates and incubated  
620 at 20°C. Optical density and luminescence were measured at 0, 3, 15, 24 and 48 hours of  
621 incubation using a Tecan200 plate reader.

622

623 **Figure 2. The *S. woodyi* supernatant induces luminescence of the *S. woodyi* MS32 strain.**  
624 *S. woodyi* was incubated 15 hours in the presence of 10% v/v of sterile VNSS as a negative  
625 control or of a *S. woodyi* culture supernatant collected after 6 hours of incubation at 20°C.  
626 Optical density and luminescence were measured using a Tecan200 plate reader.

627

628 **Figure 3. Physical map of the *lux* regulon of *S. woodyi* MS32 strain.** The arrows indicate  
629 the transcriptional direction of *luxR*, *luxI* and the *lux operon*. The *luxR* gene codes for the  
630 AHL receptor which is a transcriptional regulator; *luxI* codes for AHL synthetase; *luxC*, *luxD*  
631 and *luxE* code for the fatty acid reductase; *luxA* and *luxB* code for the subunits of luciferase  
632 and *luxG* for a flavin reductase. Putative *lux* boxes are indicated below the genes map. The  
633 conserved nucleotides C3, T4, G5, C16, A17, and G18 from *lux* boxes of a number of *V.*  
634 *fischeri* strains are in bold (11). The putative *lux* box in the promoter region of the *lux* operon

635 is located 180 bases upstream the translation start site and the *lux* box located in the intergenic  
636 region between *luxR* and *luxI* is located 60 bases upstream the ATG of *luxI*.

637

638 **Figure 4. The *luxR* or *luxI* mutants of *S. woodyi* are non-luminescent.** Growth and  
639 luminescence of the *S. woodyi* MS32 versus the  $\Delta luxR$  and  $\Delta luxI$  strains were studied in both  
640 planktonic (A) and sessile (B) conditions. All cultures were prepared in VNSS at an OD<sub>600nm</sub>  
641 of 0.1 (A) or 0.3 (B), incubated at 20°C and agitated at 120 rpm in Erlenmeyer flask for the  
642 planktonic conditions (A) and in 96-well microplates for the sessile conditions (B). Optical  
643 density and luminescence were measured up to 24 hours of incubation using a Tecan200 plate  
644 reader.

645

646 **Figure 5. The *S. woodyi*  $\Delta luxR$  or  $\Delta luxI$  mutant strains do not express the *lux* genes in**  
647 **both planktonic and sessile conditions.** Gene expression of *luxR*, *luxI*, *luxC* and *luxD* (as  
648 indicated above the graphs) was measured by RT-qPCR in the WT,  $\Delta luxI$  or  $\Delta luxR$  strains.  
649 The samples were prepared in VNSS and incubated in an Erlenmeyer flask for 7 h at 20°C  
650 and 120 rpm for the planktonic conditions (A) and incubated for 15 hours in a 24-well  
651 microplate at 20°C and 120 rpm for the sessile conditions (B). These two incubation times  
652 corresponds to the maximum intensity of luminescence in planktonic or sessile conditions, as  
653 previously shown. The concentration (ng/μl) has been calculated using the calibration curve  
654 of each gene and the expression of 16s DNA was used as an experimental control.

655

656 **Figure 6. *S. woodyi* synthesizes one or more AHL molecules.** (A) Bioluminescence  
657 induction of the 3-OH-C<sub>4</sub>-AHL biosensor *V. harveyi* BB475 strain was measured at 24 hours  
658 in the presence of 10% v/v of sterile MB as a negative control, of the *V. harveyi* BB120 WT

659 culture supernatant as a source of exogenous AHL (positive control) or of the *S. woodyi*  
660 MS32 culture supernatant collected during the post-exponential phase at 7 hours of  
661 incubation. (B) Agar plate assay for AHL production of *S. woodyi* using the biosensor strains  
662 A136 (a1-5) and CV026 (b1-5). S indicates that the strain is able (S+) or not able (S-) to  
663 synthesize an AHL *via* the presence of a functional *luxI* gene. R indicates that the strain is  
664 able (R+) or not able (R-) to detect AHL *via* its LuxR receptor. The results of *S. woodyi* WT  
665 (a3 and b3), *S. woodyi*  $\Delta luxR$  (a4 and b4) and *S. woodyi*  $\Delta luxI$  (a5 and b5) for AHL  
666 production were evaluated by comparison with experimental controls i.e. the biosensor strain  
667 versus itself (A136 and CV026) as a negative control (a1, b1) or versus the respective strains  
668 that synthesize AHLs, KYC6 and CV31532 as a positive control (a2, b2).

669

670 **Figure 7. *S. woodyi* synthesizes the C<sub>8</sub>-HSL.** (A) Total ion chromatogram of the *S. woodyi*  
671 supernatant. (B) Extracted ion chromatogram (m/z = 228) of the *S. woodyi* supernatant. (C)  
672 Chromatogram of the standards unsubstituted AHLs mix showing the retention time of each  
673 AHL. (D and E) mass spectrum of *S. woodyi* supernatant and AHL mix at t = 29 min,  
674 respectively.

675

676 **Figure 8. Only C<sub>8</sub>-HSL can induce the luminescence of *S. woodyi*.** Post-exponential culture  
677 of *S. woodyi* MS32 (A and B) or *S. woodyi*  $\Delta luxI$  (C and D) in VNSS were diluted to obtain  
678 an OD<sub>600</sub> of 0.3 and were added to 96 well white microplates. In (A) (B) and (C), the different  
679 molecules of AHLs were added in triplicate (10% v/v) to obtain a concentration of 25  $\mu$ M. In  
680 (D), the C<sub>8</sub>-HSL was added in triplicate (10% v/v) to obtain 1, 10, 25, 50 and 100  $\mu$ M. The  
681 control in all experiments was *S. woodyi* with 10% v/v of sterile VNSS. The luminescence in  
682 the case of (A), (C) and (D) was measured after 15 hours of incubation at 20°C and 120 rpm

683 using a Tecan200 plate reader. In the case of (B), a kinetic of luminescence emission was  
684 made in a Tecan200 plate reader at 20°C and 3 min of orbital shaking for 15 sec every half  
685 hour. Experiments highlighted by asterisks were significantly different compared to the  
686 control (*S. woodyi* cultures without AHLs). (Bonferroni; \*\*\*:  $p < 0,001$ ) at the indicated time.  
687 The DMSO effect used in the dissolution of AHL molecules was tested in (A), (B), (C) and  
688 each experiment was performed three times in triplicates.

689

690 **Figure 9. The AHL QS system has no effect on *S. woodyi* adhesion and biofilm formation**

691 **in a rich or a poor medium.** In (A) post-exponential strain of *S. woodyi* MS32, *S. woodyi*

692  $\Delta luxR$  or *S. woodyi*  $\Delta luxI$  in VNSS, MB or ASW were diluted to obtain an OD of 0,3 and

693 were inoculated into 96-well black microplates. After 15h of incubation at 20°C and 120 rpm,

694 non-adhered bacteria were washed with a NaCl solution and the adhered bacteria were stained

695 with SYTO9 at 1  $\mu$ M. Fluorescence intensity was measured with a Tecan plate reader ( $\lambda$

696 excitation=475 nm and  $\lambda$  emission=510 nm). In (B) post-exponential strains of *S. woodyi* WT,

697 *S. woodyi*  $\Delta luxR$  or *S. woodyi*  $\Delta luxI$  were inoculated in VNSS, MB or ASW to obtain an

698 OD<sub>600</sub> of 0,5 and were added to 96-well transparent microplates. After 48 hours of incubation

699 at 20°C without shaking, non-adhered bacteria were removed by washing with distilled water

700 and biofilm formation was quantified using CV staining. In (C and D) post-exponential *S.*

701 *woodyi* MS32 (C) or  $\Delta luxI$  (D) strains were inoculated in ASW to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.3 and

702 were incubated into microplates for 15 hours with or without 25  $\mu$ M of exogenous AHLs

703 solution. After incubation, the microplates were treated in the same manner as in (A). In (E

704 and F) post-exponential *S. woodyi* MS32 (E) or  $\Delta luxI$  (F) strains were inoculated in ASW to

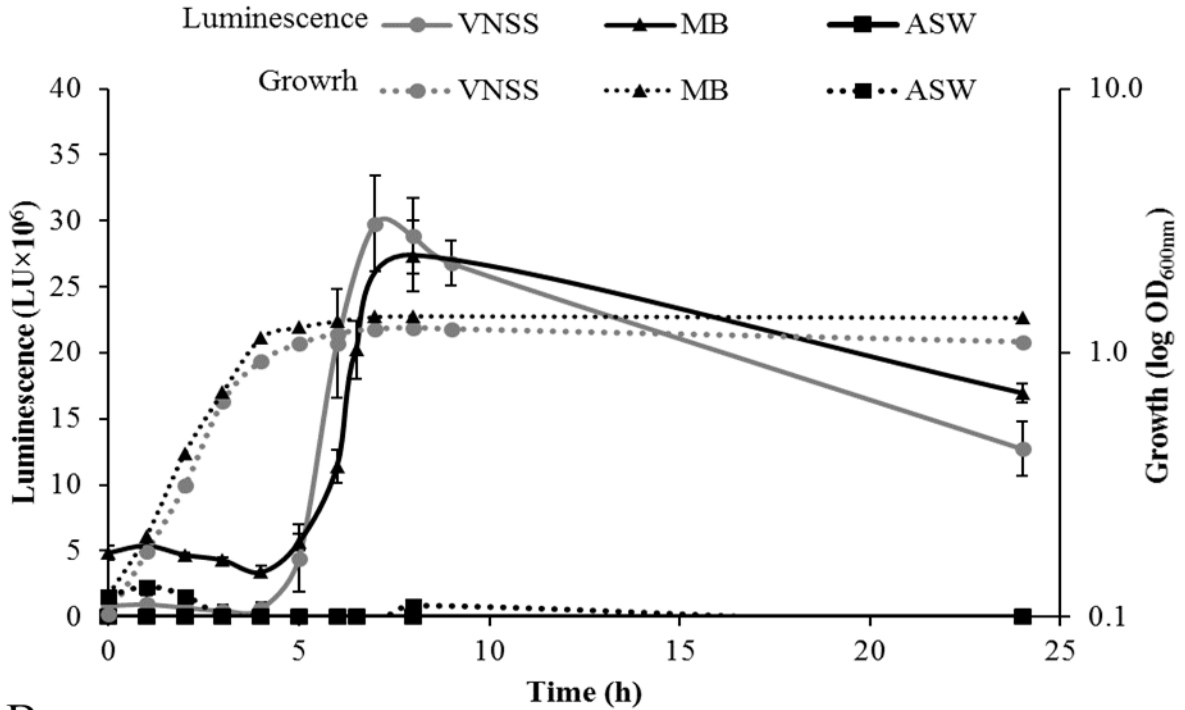
705 obtain an OD<sub>600</sub> of 0.5 and were incubated into microplates for 48h with or without 25  $\mu$ M of

706 exogenous AHLs solutions. The microplates were then treated as in (B). The experiments

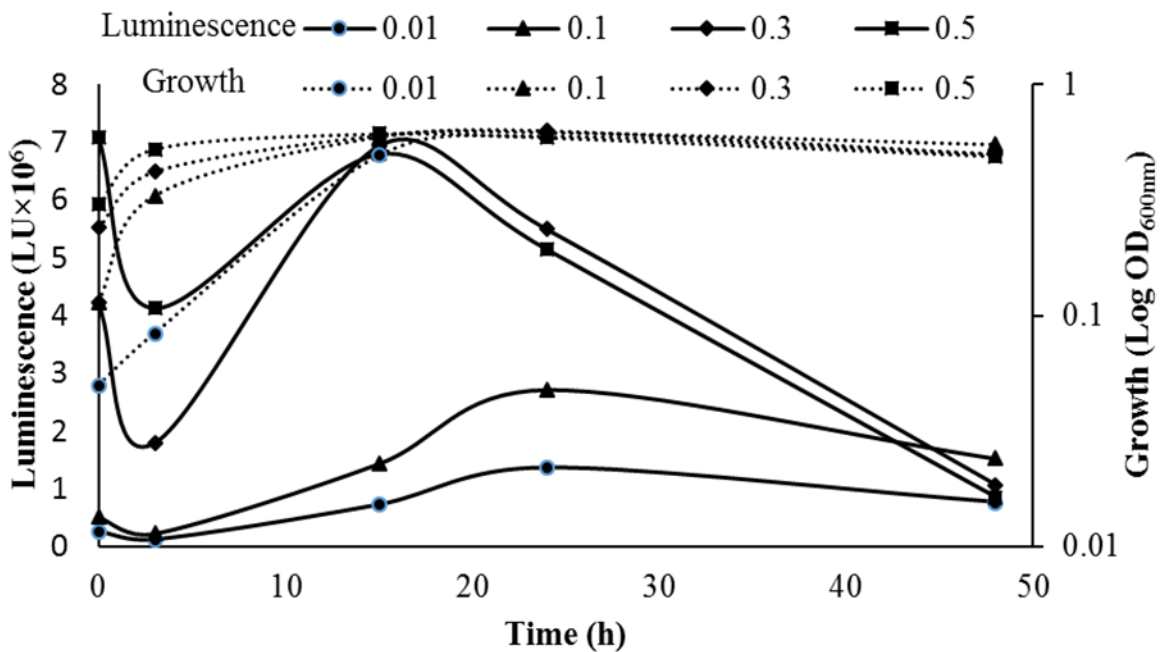


707 were performed three times in triplicate and error bars indicate the standard errors of the  
708 means.

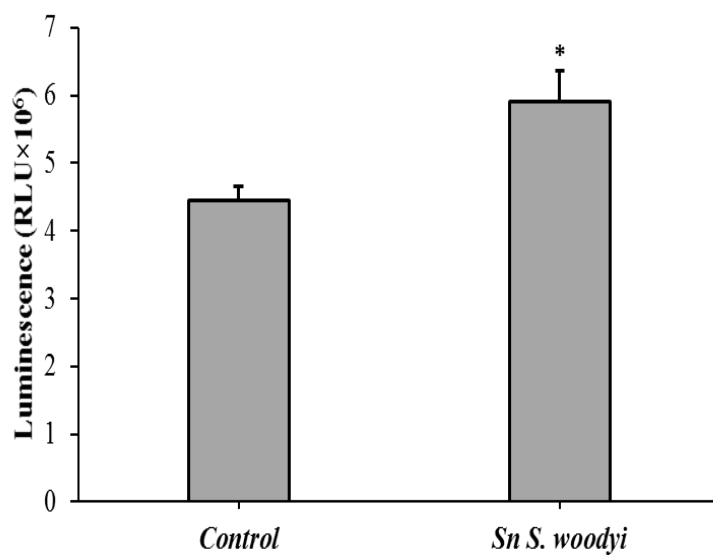
A



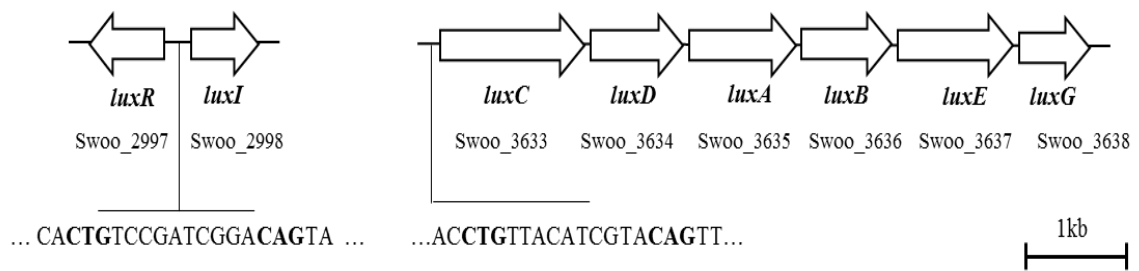
B



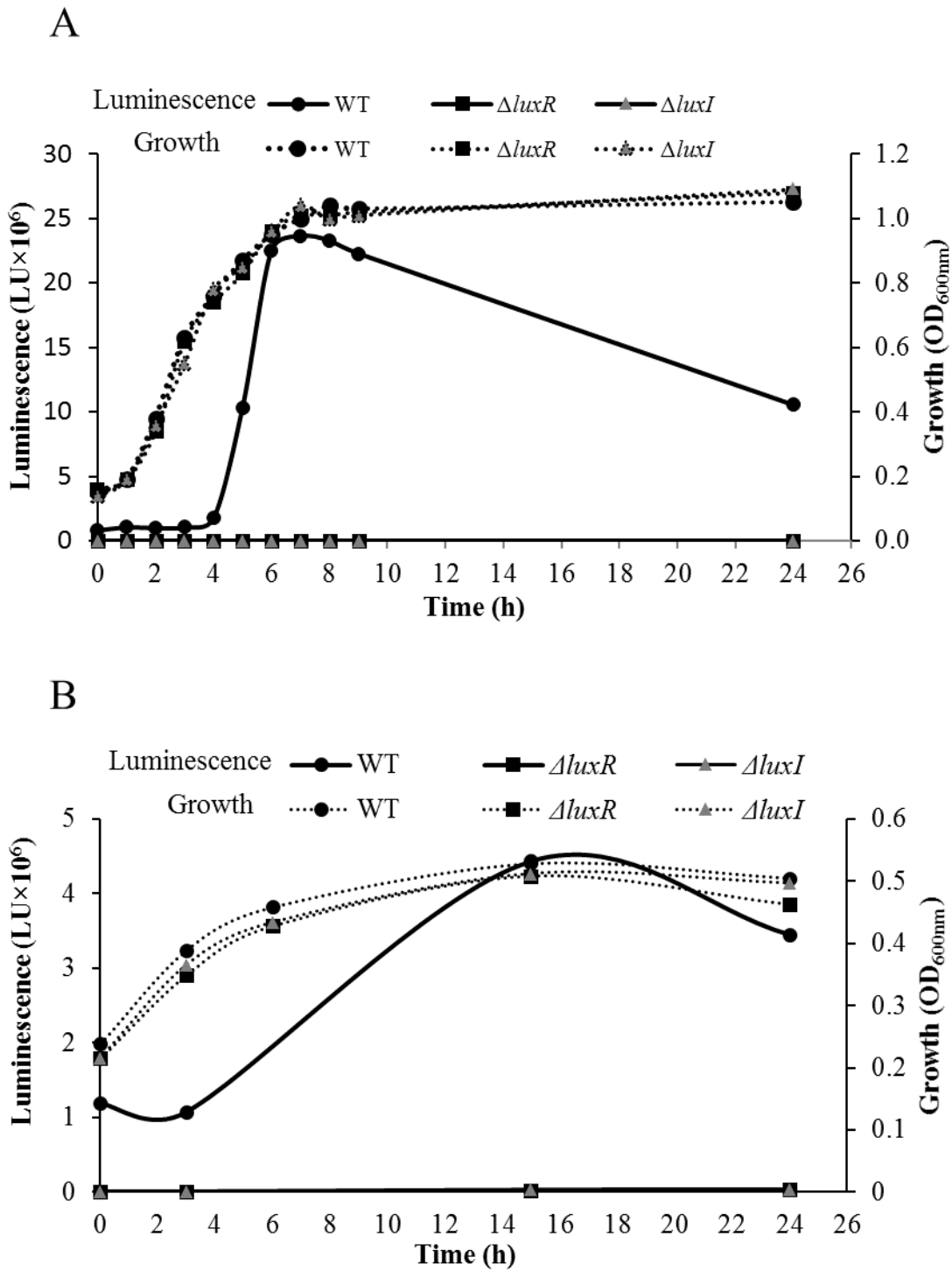
M. Hayek *et al.*, Figure 1.



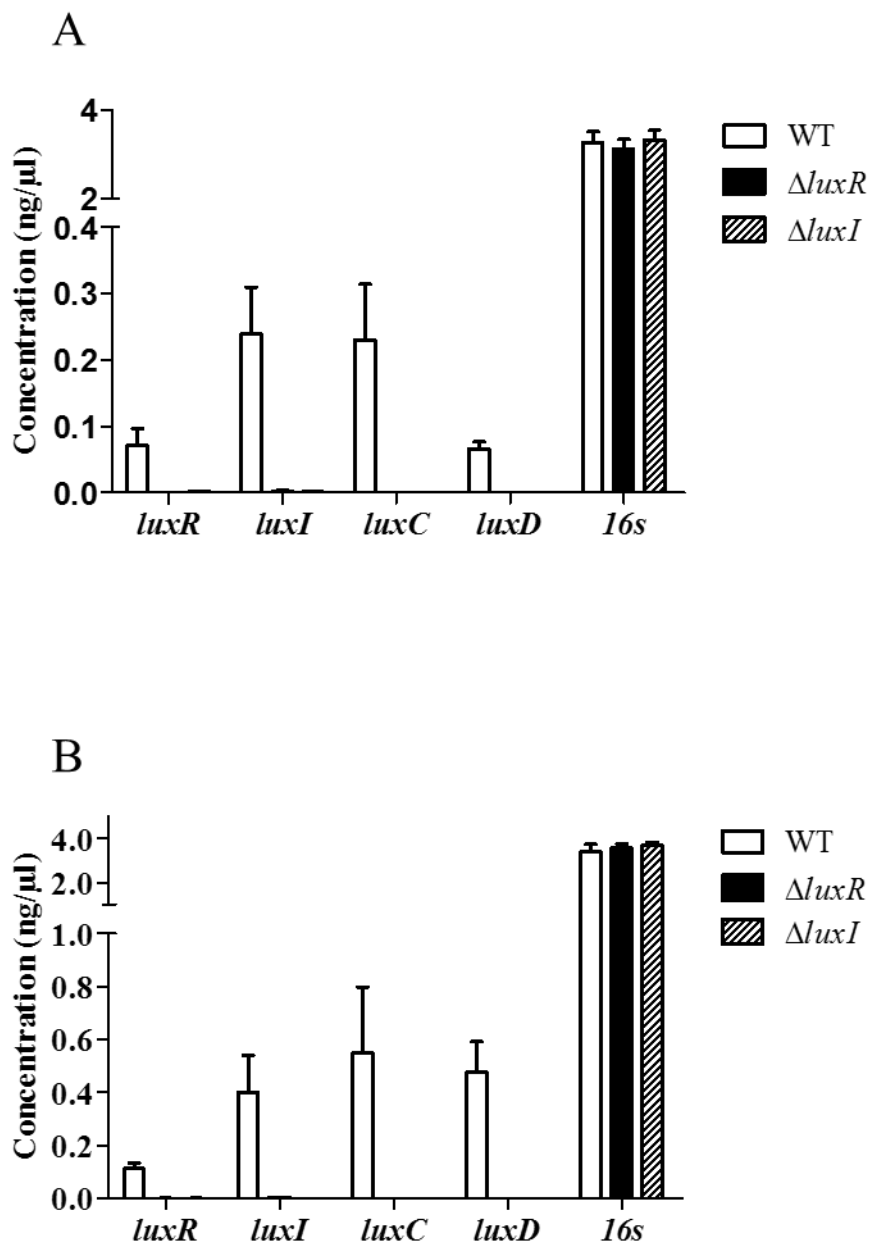
M. Hayek *et al.*, Figure 2.



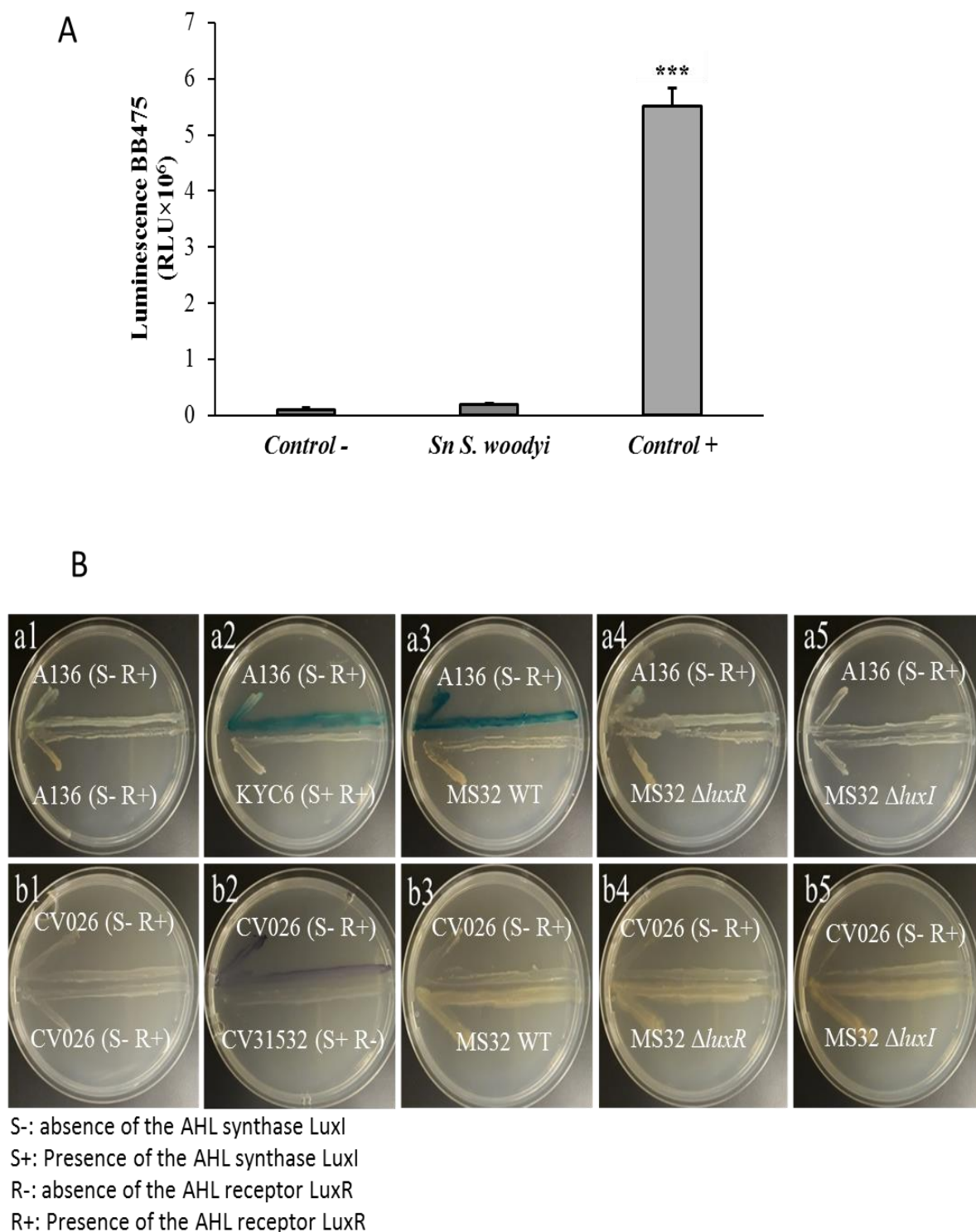
M. Hayek *et al.*, Figure 3



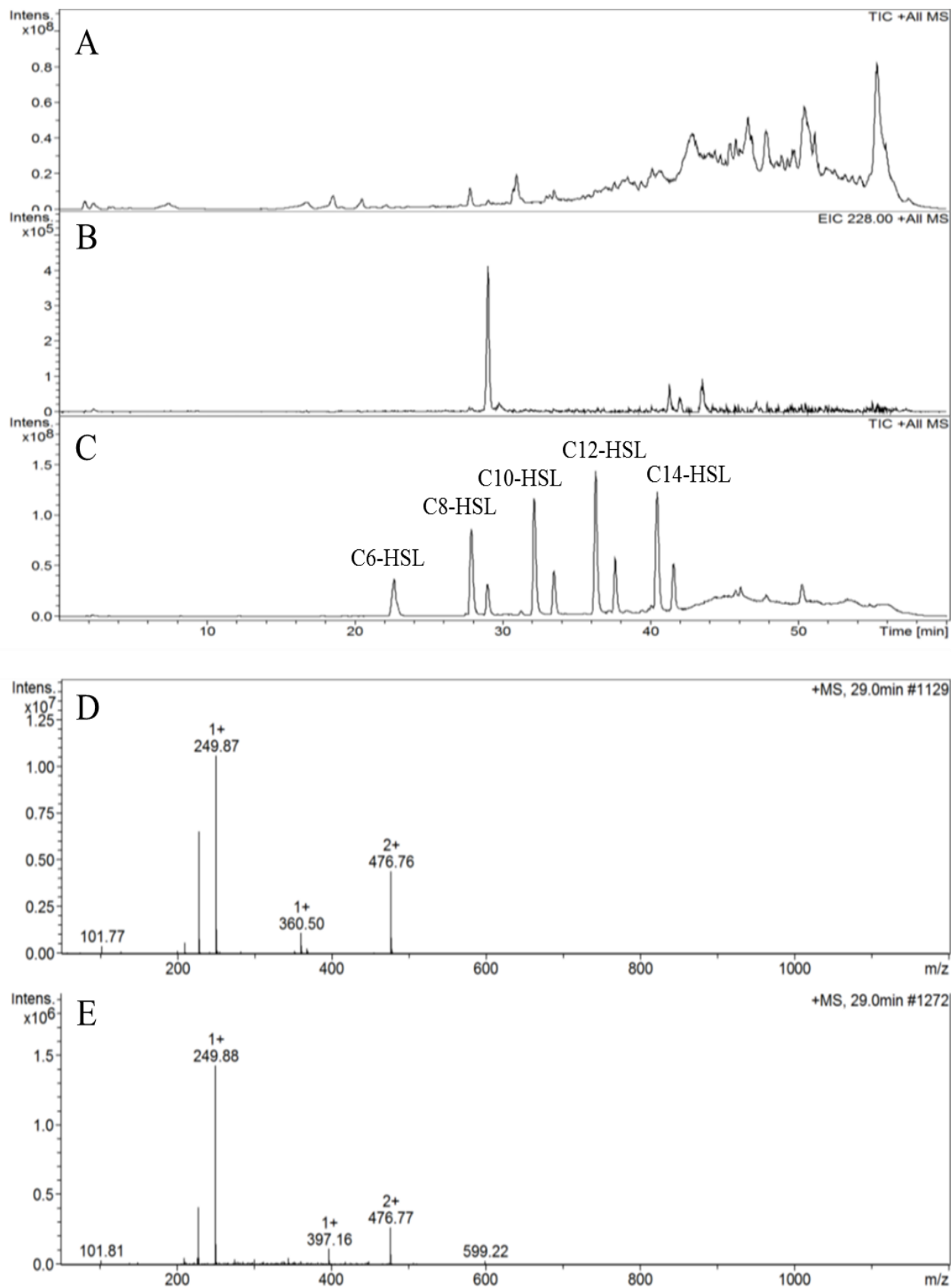
M. Hayek *et al.*, Figure 4.



M. Hayek *et al.*, Figure 5.

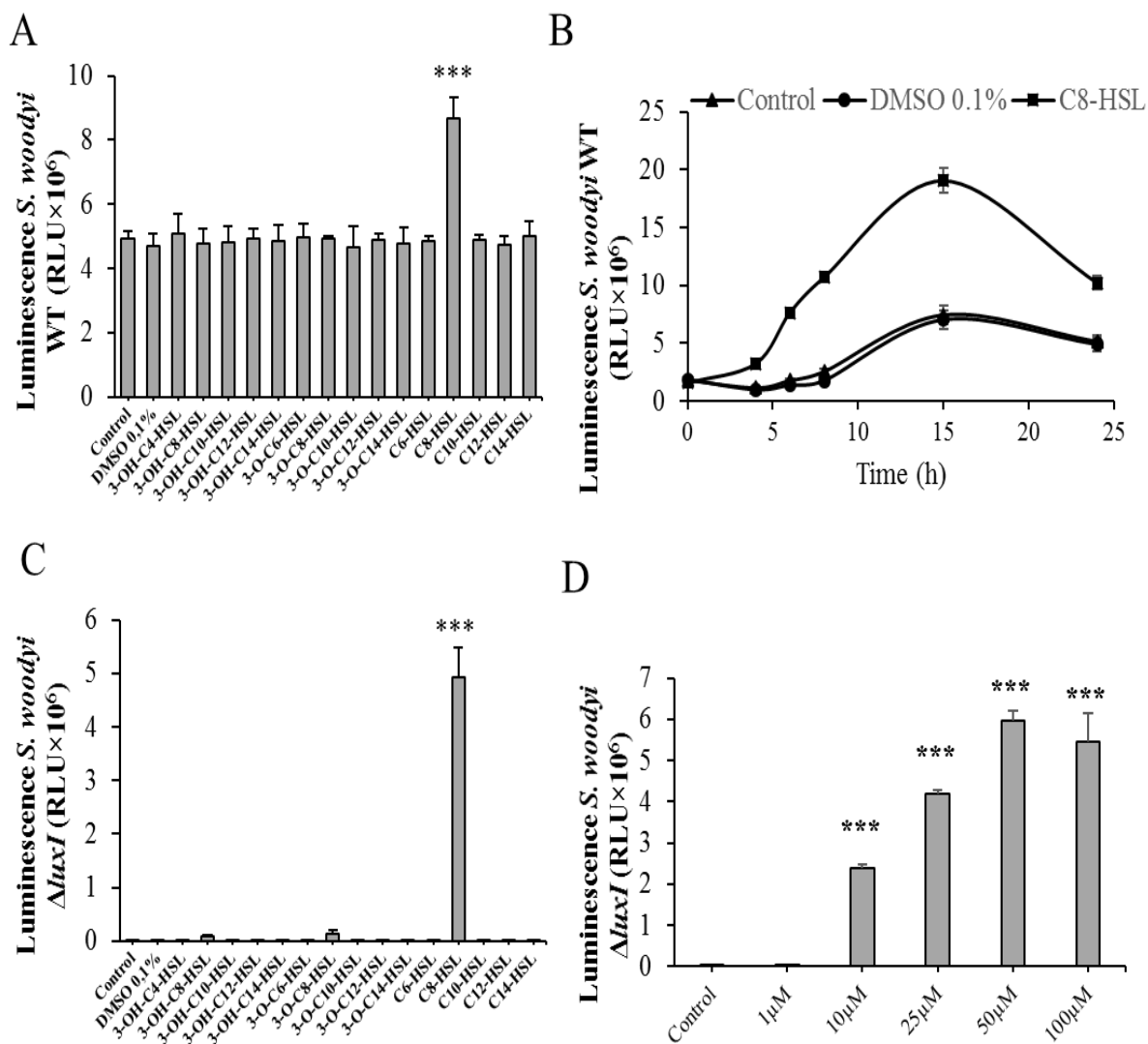


M. Hayek *et al.*, Figure 6.

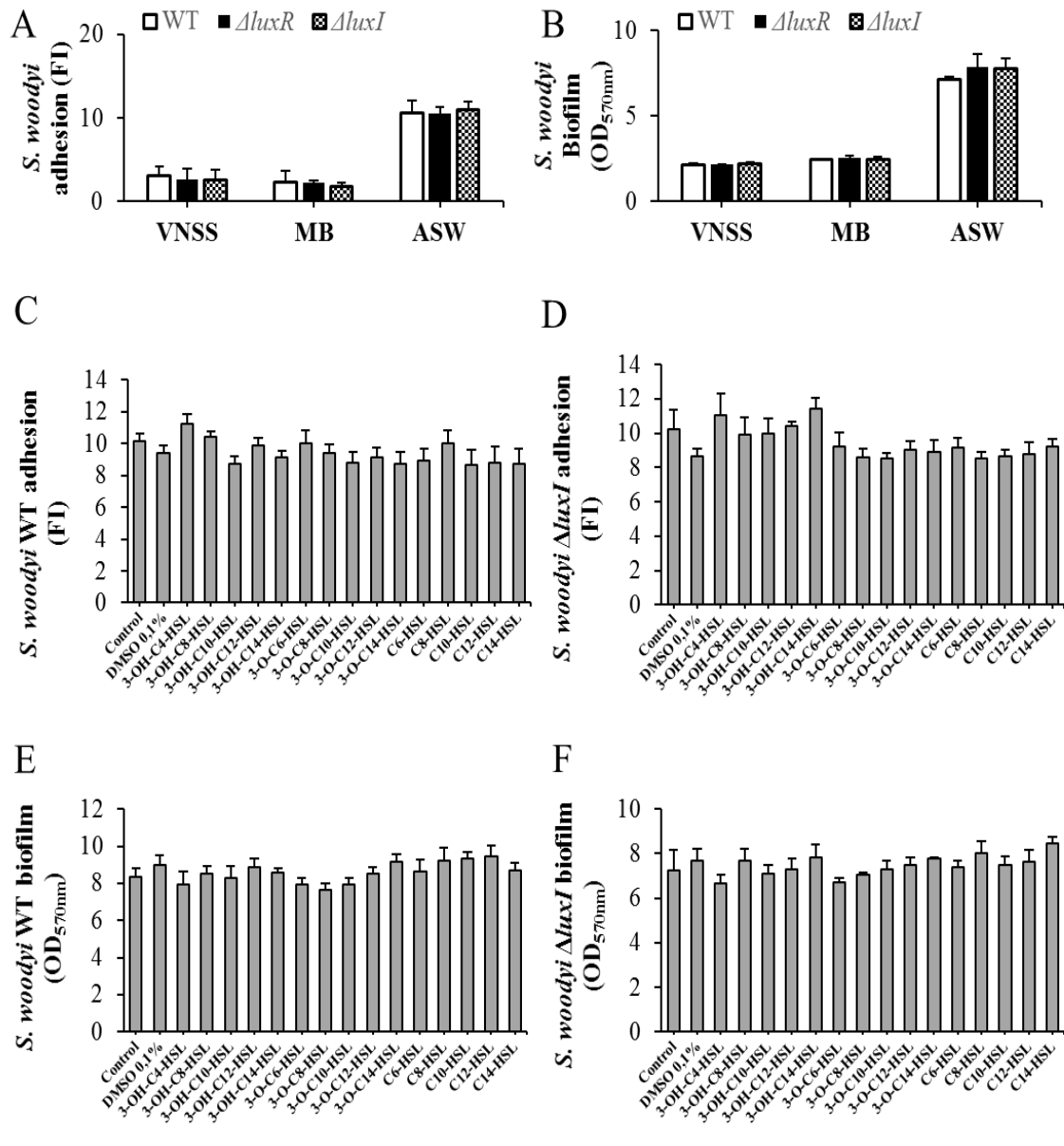


M. Hayek *et al.*, Figure 7.





M. Hayek *et al.*, Figure 8.



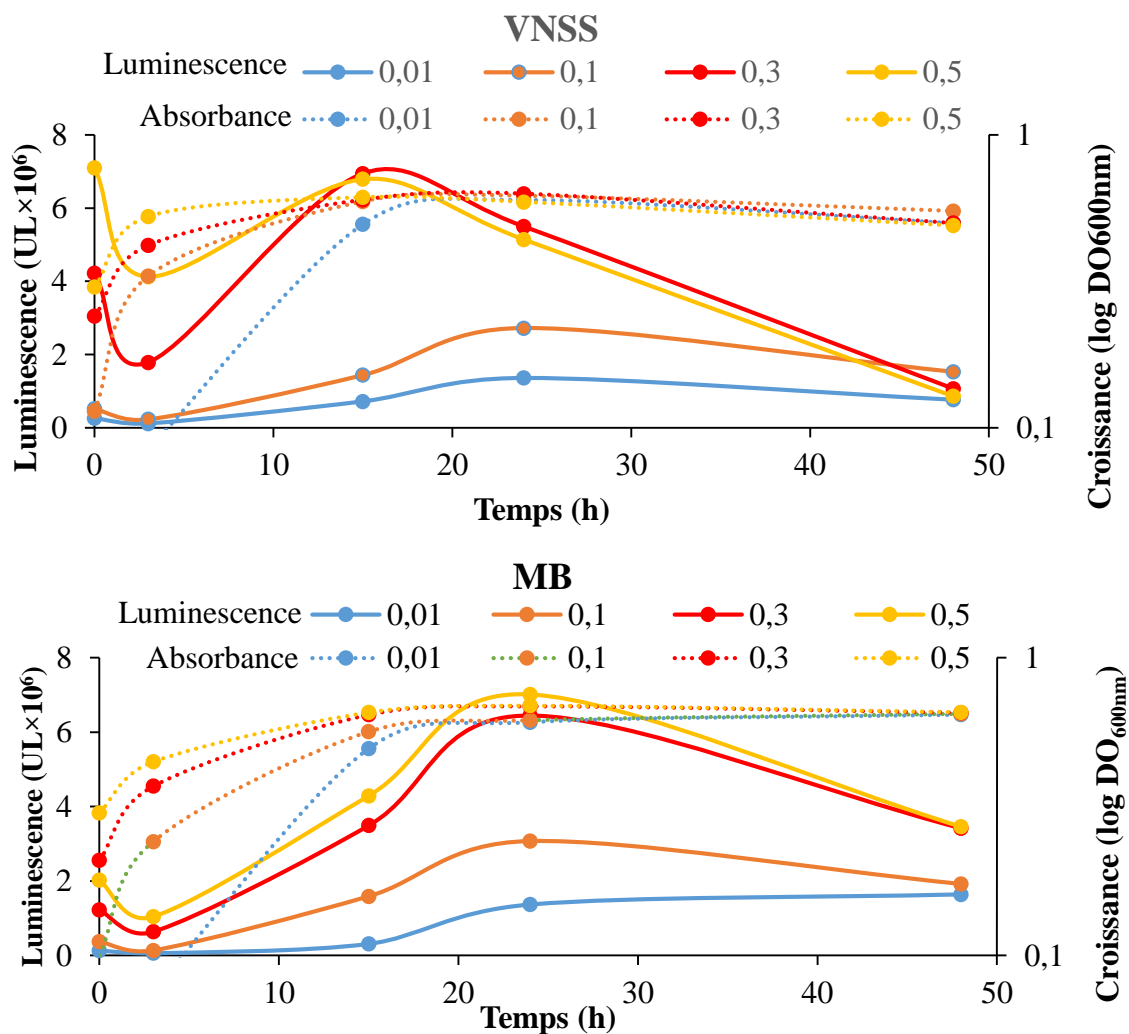
M. Hayek *et al.*, Figure 9.

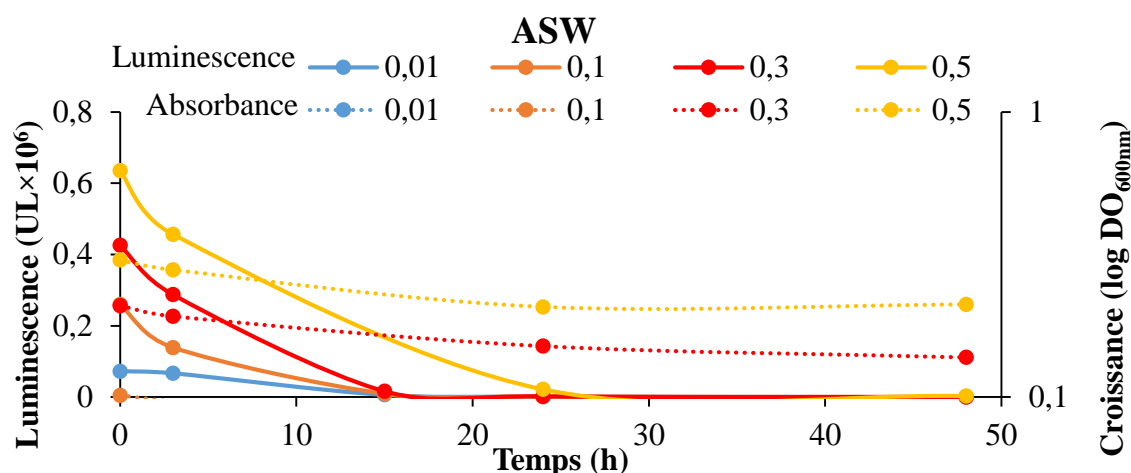


## 4. Résultats complémentaires et supplémentaires

### 4.1. Conditions sessiles de culture de *S. woodyi*

Des suivis de croissance et de luminescence de *S. woodyi* ont été réalisés en microplaques (conditions sessiles) dans les mêmes milieux (VNSS, MB, ASW), en partant de plusieurs concentrations d'inoculum bactérienne ( $DO_{600nm} = 0,01, 0,1, 0,3, \text{ et } 0,5$ ), afin de déterminer le temps nécessaire à *S. woodyi* pour atteindre le maximum de luminescence mais aussi afin de choisir la concentration qui donnerait le delta d'émission de luminescence le plus important dans ces conditions. Les résultats de ces suivis sont présentés dans la figure 59. Ces résultats servent à compléter les résultats affichés dans la figure 1 de l'article dont seulement le milieu VNSS a été présenté.





**Figure 59.** Suivi de la croissance et de la luminescence de *S. woodyi* en conditions sessiles dans du VNSS, MB et ASW.

Une culture en phase post exponentielle de croissance de *S. woodyi* en VNSS ou MB a été diluée dans le même milieu pour obtenir plusieurs  $DO_{600nm}$ , 0,01, 0,1, 0,3, 0,5. Les différents inocula obtenus sont incubés ensuite à 20°C et 120 rpm dans des microplaques blanches à 96 puits. La même démarche a été effectuée dans le cas d'ASW à partir d'une culture en phase post exponentielle effectuée en VNSS et centrifugée pendant 10 min à 6000 rpm. La croissance ( $DO_{600nm}$ ) et la luminescence ont été mesurées à 0, 3, 15, 24 et 48 h en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

Comme en conditions planctoniques, aucune croissance et luminescence ne sont observées dans le milieu minimum ASW (Figure 59). La luminescence de *S. woodyi* dans ce milieu est déjà très basse à 0 h (ASW est inoculé par un culot de *S. woodyi* obtenu suite à une centrifugation d'une culture en phase post exponentielle dans VNSS) et diminue rapidement pour tous les inocula testés.

Dans le cas de VNSS et MB, la croissance de *S. woodyi* commence dès le temps 0 et atteint la phase post exponentielle de croissance entre 15 h et 24 h. L'expression de la luminescence dans ces deux milieux commence dès 3 h pour toutes les  $DO_{600nm}$  réalisées et atteint un maximum après 15 h d'incubation dans le cas des inocula  $DO_{600nm}$  à 0,3 et 0,5 et après 24 h dans le cas des inocula  $DO_{600nm}$  à 0,01 et 0,1 en VNSS. Néanmoins, dans le cas du MB, la luminescence atteint son maximum plus tardivement, après 24 h d'incubation pendant la fin de la phase post exponentielle et ceci pour toutes les  $DO_{600nm}$  (0,01, 0,1, 0,3 et 0,5). La luminescence diminue ensuite pendant la phase stationnaire, probablement en raison du manque de nutriments pour les bactéries. Ces résultats montrent que similairement aux conditions planctoniques, en conditions sessiles, la luminescence de *S. woodyi* est dépendante de sa croissance. Par conséquent, une  $DO_{600nm}$  de 0,3 et un temps d'incubation de 15 h ont été utilisées pour effectuer les manipulations concernant la luminescence de *S. woodyi* en conditions sessiles dans le milieu VNSS.

## 4.2. QS chez *S. woodyi*

Ces résultats servent à compléter la partie de l'article concernant la présence des gènes *luxI*, *luxR* chez *S. woodyi* (Page 189).

### 4.2.1. Analyse de LuxI

Le produit du gène putatif *luxI*, Swoo\_2998 annoté comme une N-acyl-L-homoserine lactone synthétase chez *S. woodyi* est une protéine de 225 acides aminés. Cette protéine montre une identité de 28% avec LuxI (synthase d'AHL) de *V. fischeri* tandis qu'elle ne présente aucune homologie avec LuxM (synthase d'AHL) de *V. harveyi*. Selon Li and Nair, 6 résidus d'acides aminés conservés dans le domaine N-terminal de la protéine LuxI sont responsables de la fixation de son substrat, le SAM (substrat de la synthèse d'AHL). Il s'agit des arginines 24, 71 et 104, glutamate 46, aspartates 51 et glycine 68 (selon la numérotation de la protéine RhII) (Li and Nair, 2012). La figure 60 montre l'alignement de la séquence protéique de la protéine LuxI codée par Swoo\_2998 avec différents LuxI connus comme CviI de *C. violaceum* (AAP32920.1), LuxI de *V. fischeri* (AAP22376.1) et RhII (AAC44037.1) et LasI (BAT66620.1) de *P. aeruginosa*.

|           |                                                                |     |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-----|
| CviI.     | -----MKDFPPLQQ---GGLVLEWNTETKLRQLWAFRHRIFREQLQWVPL             | 43  |
| Swoo_2998 | -MQELNQTDSQFNKSNLPSQVDTSSHYQITHNPTTQQWDKLHQLRAEVFCRELAWGS      | 59  |
| EsaI      | -MLELFD-----VSYE-----ELQTRSEELYKLRKKTFSDRLGWEVI                | 37  |
| RhII.     | -MIELLS-----ESLE-----GLSAAAMIAELGRYRHQVFIEKLGHDVW              | 37  |
| LasI.     | MIVQIGR-----RE-----EFDKLLGEMHKLRAQVFKERKGNQVDS                 | 36  |
| LuxI.     | MTIMIKK-----SDFL-----AIPSEEYKGIILSLRYQVFKORLEWDLV              | 38  |
|           | : * . * . *                                                    |     |
| CviI.     | CEDGFDRD---AYDDFSDNLVLC----RDGEVVGAIRLTTGEHPFMLEEEFSRLLAPGER   | 96  |
| Swoo_2998 | PEDKREYD---NFDNTTTHLGLF----VRGQATGYLRHHHNSPMMINTIFNQLLPDGAP    | 112 |
| EsaI      | CSQGMESD---EFDGPGTRYILGICE---GQLVCSVRF TSLDRPNMITHTFQHCFSV-DT  | 90  |
| RhII.     | STSRVRDQEFDQFDHPQTRYIVAM---SRQIGCGCARLLPTTDAYLLKQVDFAYL-CS-ET  | 92  |
| LasI.     | VIDEMEID---GYDALSPYYMLIQEDTPEAQVFGCNRILDTTGPYMLKNTFPPELLHG-KE  | 92  |
| LuxI.     | VENNLESD---EYDNSNAEYIYACDDT--ENVSGCNR LXPTTGDYMLKSVFPPELLGQ-QS | 92  |
|           | . : :* *: : *                                                  |     |
| CviI.     | IGKGAEYSEITRLAVDREALGARESIMAA--LLYLGAWLNSQVQGVWRWYFVWEPVFYR    | 154 |
| Swoo_2998 | TPQEANACEVSRLLESSHGRGKTKVNNYPPHLLLSYLQNYCSSKNIRYVYVWVTPATRV    | 172 |
| EsaI      | LPAY--GTESSRFVVDKARARALLGEHYPIQVLF LAMVNNAAQNNAYGNIYTEVSRAMLK  | 148 |
| RhII.     | PPSDPSVWELSRYAASAADD-----PQLAMKIFWSSLQCAWYLGASSVVAVTTTAMER     | 145 |
| LasI.     | APCSPHINELSRFAINSGQKGS-LGF-SDCTLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTTVGVEK   | 150 |
| LuxI.     | APKDPNIVELSRFVAVGKNSSKINNSA-SEITMKLFEAIYKHAVSQGITETVTVTSTAIEK  | 151 |
|           | * :* .                                                         |     |

**Figure 60.** Alignement protéique de LuxI chez *S. woodyi* (Swoo\_2998).

Les résidus marqués par un astérisque sont ceux conservés chez toutes les protéines de type LuxI. L'acide aminé en position 140 selon la numérotation d'EsaI (AAA82096.1) est marqué par un rectangle noir.

La figure 60 montre que la protéine LuxI de *S. woodyi* possède tous les résidus d'acides aminés conservés chez les différentes protéines de type LuxI. Citons par exemple les arginines (R) en positions 24, 71 et 104 (selon la numérotation de RhII). Ce qui confirme que cette protéine est un LuxI fonctionnel, capable de lier le SAM pour synthétiser l'AHL.

En plus, Gould *et al* ont suggéré en 2006 une corrélation entre le résidu d'acide aminé trouvé en position 140 (selon la numérotation de la protéine EsaI) et l'état d'oxydation du carbone en position 3 de la chaîne d'acyle d'AHL synthétisée. Ils ont trouvé que la présence de thréonine à cette position est en corrélation avec la production de 3-oxo-HSLs, tandis que la présence d'alanine ou de glycine amène à une production d'AHLs non substituées, alors qu'une sérine peut être corrélée avec la production de 3-hydroxy-HSLs (Gould *et al.*, 2006). Parmi les LuxI présentés dans la figure 60, la thréonine en position 140 est trouvée chez EsaI et LuxI de *V. fischeri* qui synthétisent tous les deux la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL ainsi que chez LasI responsable de la synthèse de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL chez *P. aeruginosa*, tandis que l'alanine est trouvée à cette position chez RhII responsable de la synthèse de C<sub>4</sub>-HSL. Dans le cas de CviI qui produit la C<sub>6</sub>-HSL, l'AHL qui module l'expression de l'opéron *vio* chez *C. violaceum*, une phénylalanine est trouvée, alors que dans le cas LuxI (Swoo\_2998) une méthionine est retrouvée à ce site. Sachant qu'il a été démontré dans cette étude que LuxI produit la C<sub>8</sub>-HSL, une meilleure caractérisation de cette position qui semble être impliquée dans la liaison d'acyle-ACP est nécessaire pour regrouper toutes les possibilités afin de créer une relation plus fiable entre l'état d'oxydation du carbone en position 3 de la chaîne d'acyle d'une molécule d'AHL et le résidu d'acide aminé trouvé en position 140 (selon la numérotation d'EsaI).

#### 4.2.2. Analyse de LuxR

Le génome de *S. woodyi* contient 4 gènes putatifs *luxR*, Swoo\_1991, Swoo\_2997, Swoo\_4031 et Swoo\_4115. Seul le gène Swoo\_2997 est associé avec un gène *luxI* (Swoo\_2998). Afin de déterminer la fonctionnalité de ces LuxR, alors leurs capacités à lier des molécules d'AHL et à réguler l'expression génétique par la liaison avec l'ADN, un alignement de la séquence protéique de ces LuxR putatifs avec les séquences d'autres LuxR fonctionnels comme TraR d'*A. tumefaciens* (AAZ50597.1), LuxR de *V. fischeri* (AAQ90229.1), RhIR (AAC44036.1) et LasR (AAG04819.1) de *P. aeruginosa* a été effectué. La figure 61 montre les résultats de cet alignement.



Figure 61. Alignement protéique des LuxR de *S. woodyi*.

Les acides aminés marqués sont ceux conservés dans le domaine N-terminal et C-terminal des protéines homologues LuxR (selon la numérotation de TraR). Seul le gène Swoo\_2997 est associé avec un gène *luxI*.

La figure 61 montre l'alignement des protéines annotées comme LuxR dans le génome de *S. woodyi* avec d'autres protéines LuxR bien caractérisées comme TraR, RhIR ou LasR. Les acides aminés conservés dans le domaine N-terminal, le tryptophane 57 (W57), la tyrosine 61 (Y61), l'aspartate 70 (D70), la proline 71 (P71) et la glycine 113 (G113) (selon la numérotation de TraR) sont impliqués dans la fixation d'AHLs (Chai and Winans, 2004; Subramoni et al., 2015) et ceux conservés dans le domaine C-terminal, le glutamate 178 (E178), la leucine 182 (L182), la glycine 188 (G188) sont impliqués dans la fixation des LuxR sur l'ADN (Li and Nair, 2012; Subramoni et al., 2015). L'ensemble de ces acides aminés conservés sont présents chez la protéine LuxR (Swoo\_2997) de *S. woodyi*. Ce qui est



en adéquation avec nos résultats précédents montrant la capacité de LuxR Swoo\_2997 à lier le C<sub>8</sub>-HSL et à réguler l'expression de l'opéron *lux* chez *S. woodyi*.

Les résultats concernant les autres LuxR-solos putatifs de *S. woodyi* sont résumés dans le tableau 20.

**Tableau 20.** Les acides aminés trouvés dans les domaines N-terminal et C-terminal des LuxR de *S. woodyi*.

|                  | Acides aminés conservés dans le domaine Nt<br>(site de liaison des AHLs) |     |     |     |      | Acides aminés conservés<br>dans le domaine Ct (site<br>de liaison avec l'ADN) |      |      |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|
|                  | W57                                                                      | Y61 | D70 | P71 | G113 | E178                                                                          | L182 | G188 |
| <b>Swoo_1991</b> | Y                                                                        | H   | A   | E   | Gap  | Q                                                                             | L    | G    |
| <b>Swoo_4031</b> | V                                                                        | K   | D   | K   | D    | E                                                                             | C    | G    |
| <b>Swoo_4115</b> | V                                                                        | Q   | S   | P   | Gap  | E                                                                             | M    | K    |

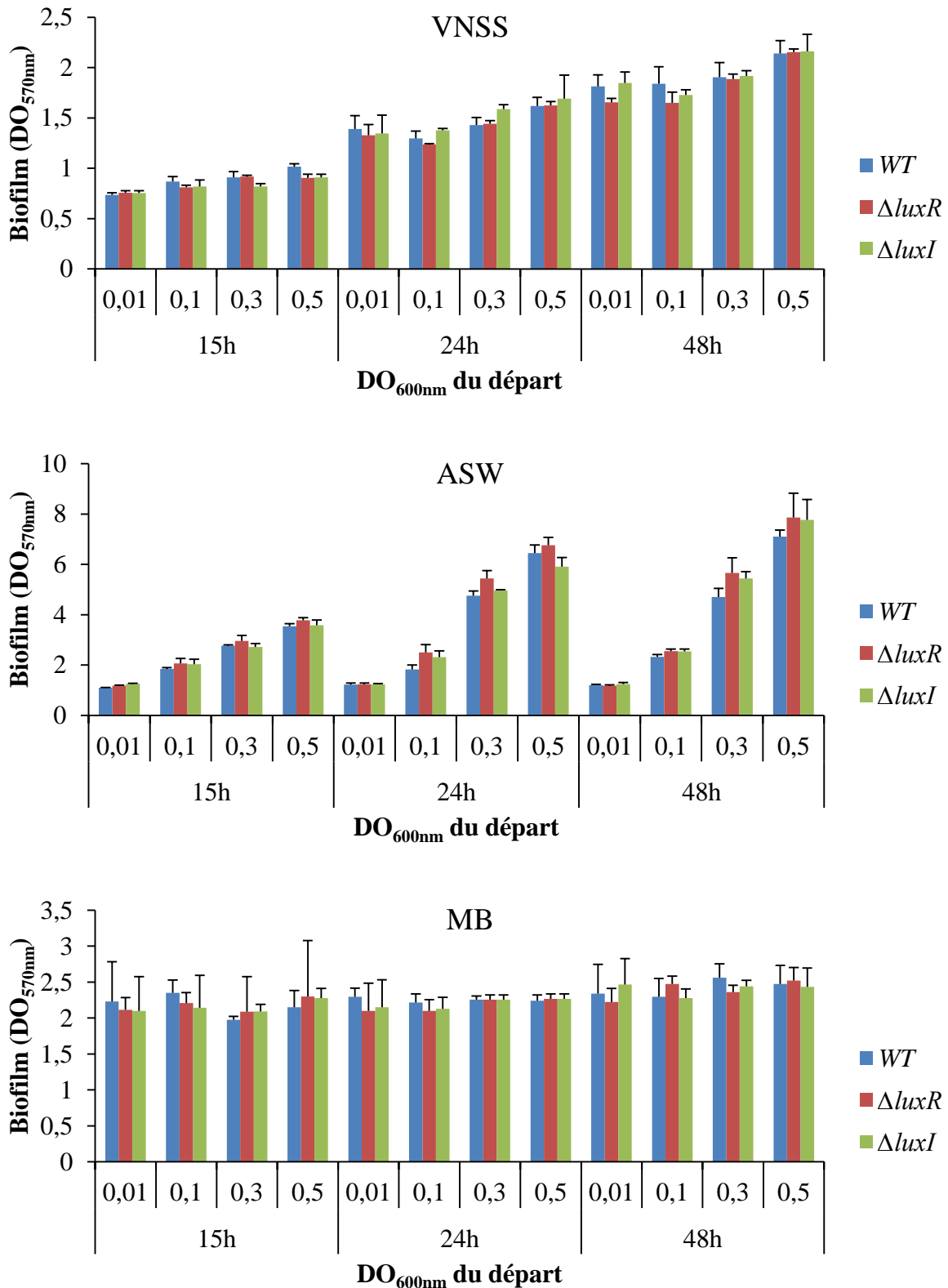
V : valine/ H : histidine/ K : Lysine/ A : alanine/ S : sérine/ Q : glutamine/ C : cysteine/ G : glycine/  
Gap : un écart

Comme montré dans le tableau 20, les LuxR-solo putatifs de *S. woodyi* (Swoo\_1991, Swoo\_4031, Swoo\_4115) ne possèdent pas les acides aminés conservés responsables de la fixation d'AHL et de liaison avec l'ADN. Ce qui indique que ces protéines sont des orthologues LuxR non fonctionnels qui ne peuvent pas fixer une molécule d'AHL et se lier à l'ADN.

### 4.3. QS et phénotypes associés à la formation du biofilm chez *S. woodyi*

#### 4.3.1. Effet d'inactivation de QS sur la formation du biofilm chez *S. woodyi*

Il a été démontré dans la partie 3 (Article, page 194) que la mutation au niveau de *luxR* ou *luxI* n'affecte ni l'adhésion ni la formation du biofilm chez *S. woodyi* dans le milieu ASW alors que le QS régule chez cette bactérie la luminescence. Afin de confirmer cette hypothèse, un suivi de la formation du biofilm sur 48 h a été réalisé dans les différents milieux de cultures, VNSS, MB, ASW en partant de plusieurs DO<sub>600nm</sub> initiales, 0,01, 0,1, 0,3 et 0,5. Les résultats obtenus avec ces suivis sont présentés dans la figure 61.

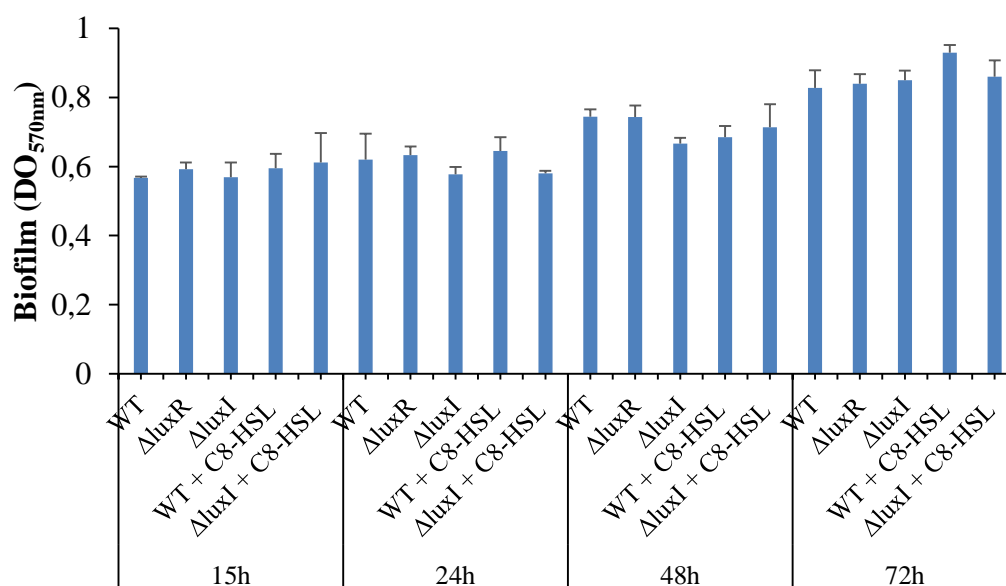


**Figure 62.** Effet des mutations *luxI* et *luxR* sur la formation de biofilm chez *S. woodyi* dans les milieux VNSS, ASW, MB.

Une culture de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en phase post exponentielle de croissance en VNSS ou MB a été diluée dans le même milieu pour obtenir plusieurs  $DO_{600nm}$ , 0,01, 0,1, 0,3 et 0,5. Dans le cas d'ASW, une culture en VNSS de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en phase post exponentielle de croissance a été centrifugée pendant 10 min à 6000 rpm et le culot a été resuspendu en ASW puis dilué pour obtenir les différents inocula ( $DO_{600nm}$  à 0,01, 0,1, 0,3 et 0,5). Les cultures diluées (de tous les milieux) ont été ensuite incubées à

20°C en conditions statiques dans des microplaques transparentes à 96 puits. Après 15, 24 et 48 h d'incubation, un marquage au CV a été réalisé et la DO<sub>570nm</sub> a été mesurée avec un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée en triplicat.

Les résultats affichés dans la figure 62 concordent avec ceux obtenus précédemment et montrant que la formation de biofilm ne semble pas affectée par le mécanisme de QS dans les conditions testées (Article, page 194). En effet, la mutation du système AHL de *S. woodyi* ne semble pas affecter la formation de biofilm chez cette bactérie. Similairement, la capacité de la molécule signal, C<sub>8</sub>-HSL, synthétisée par *S. woodyi* à induire la formation du biofilm a été testée sur la souche sauvage, et les mutants  $\Delta luxI$  et  $\Delta luxR$ . La C<sub>8</sub>-HSL, qui complémente la mutation *luxI* pour l'émission de luminescence et induit également la luminescence d'une souche sauvage (Article, page 193), a été ajoutée sur le biofilm de *S. woodyi* sauvage et délété de *luxI* rincé après 3 h d'incubation et un suivi de la formation du biofilm a été effectué pendant 72 h.



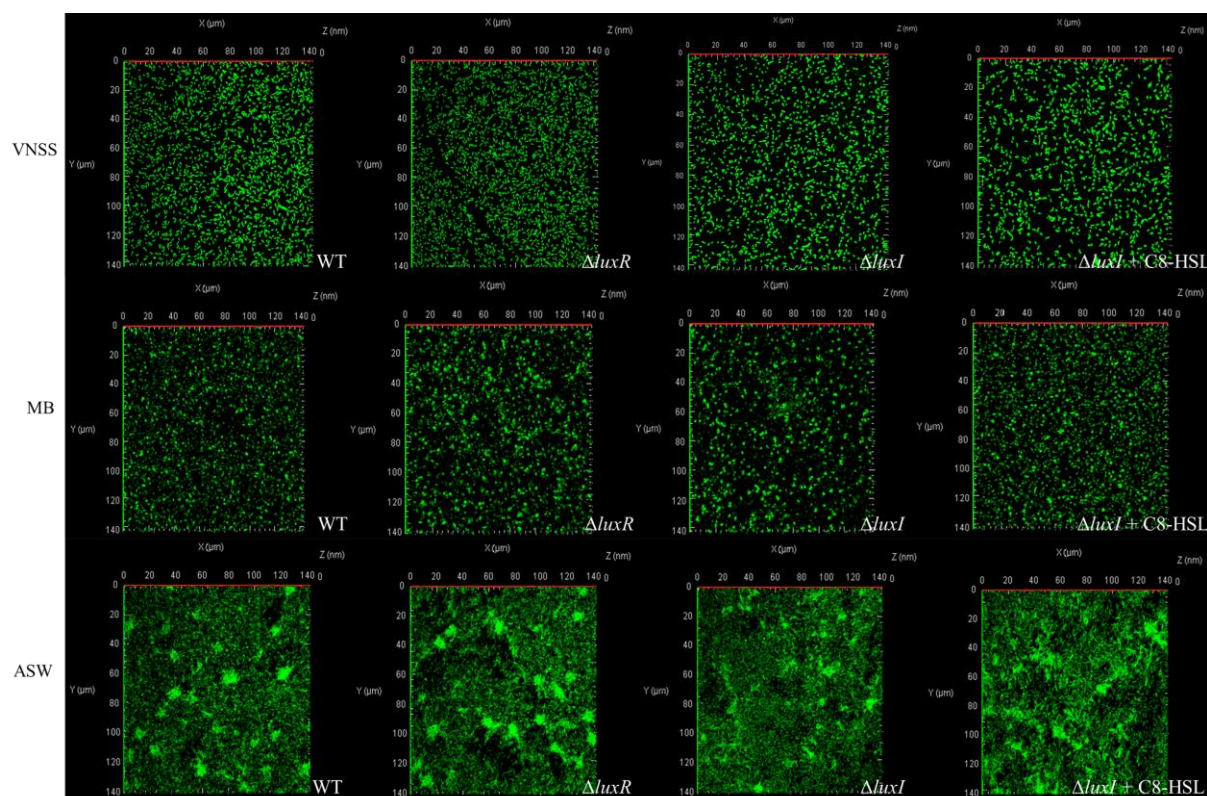
**Figure 63.** Effet des mutations  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  et de l'ajout de la C<sub>8</sub>-HSL sur la formation du biofilm.

Une culture de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été centrifugée pendant 10 min à 6000 rpm et le culot a été récupéré dans de l'ASW stérile puis dilué pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Les cultures ont été ensuite incubées dans des microplaques transparentes à 96 puits. Après 3 h d'incubation, trois lavages avec de l'ASW ont été effectués et 10% v/v de C<sub>8</sub>-HSL à une concentration de 50  $\mu$ M ont été ajoutés dans des puits contenant de *S. woodyi* sauvage ou  $\Delta luxI$ . Après 15, 24, 48 et 72 h d'incubation à 20°C en condition statique, le biofilm formé a été marqué au CV et la DO<sub>570nm</sub> a été mesurée avec un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée en triplicat.

Les résultats de la figure 63 confirment que la régulation de la formation du biofilm chez *S. woodyi* est indépendante de son système AHL de QS dans les conditions testées, puisqu'aucune différence significative n'est observée entre le biofilm formé par les souches mutantes et la souche sauvage de *S. woodyi* à 15, 24, 48 et 72 h. De plus, la présence de C<sub>8</sub>-

HSL dans le milieu n'influence pas la formation du biofilm de la souche sauvage et  $\Delta luxI$ . Ceci indique que cette molécule signal ne possède pas un rôle régulateur du biofilm chez *S. woodyi*.

En outre, plusieurs auteurs ont rapporté le rôle du système AHL de QS dans la régulation de la structure et de l'architecture du biofilm sans pour autant modifier la quantité de biofilm formé. C'est le cas par exemple chez *P. aeruginosa* via le système *rhl* (Wolska *et al.*, 2016; Jakobsen *et al.*, 2017), *B. thailandensis* via le système *bta1* (Tseng *et al.*, 2016) et *S. liquefaciens* MG1 via le système *swr* (Labbate *et al.*, 2004). Pour vérifier si c'est le cas chez *S. woodyi*, une observation en microscopie à balayage laser confocal (CLSM) du biofilm formé dans différentes conditions a été effectuée. Pour ce faire, des essais de transformation ou de conjugaison de *S. woodyi* par un plasmide portant le gène de la GFP (*Green fluorescent protein*) ont été réalisés afin de faciliter l'observation du biofilm formé par un microscope confocal à balayage laser. Des conjugaisons bactériennes entre *S. woodyi* sauvage et *E. coli* WM3064 pX5-GFP dans plusieurs conditions ont été réalisées. Malgré différentes conditions testées en faisant varier le milieu de culture (MB ou MB-LB), la température d'incubation (20 ou 25°C), la phase de croissance bactérienne (exponentielle, post exponentielle ou stationnaire), le rapport *S. woodyi*/*E. coli* (1/1 ou 1/3) ou le processus de conjugaison (par *spotting*, conjugaison sur filtre ou grâce au MgSO<sub>4</sub>), aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir de clones de *S. woodyi* fluorescents. L'observation du biofilm formé à 24, 48, 72 et 240 h par *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$ ,  $\Delta luxI$  et  $\Delta luxI$  incubées en présence de C<sub>8</sub>-HSL (afin de visualiser une potentielle complémentation du phénotype par l'AHL) dans VNSS, MB et ASW a été alors réalisée en utilisant un marquage des bactéries par le fluorochrome Syto9. Sachant que les résultats obtenus aux différents temps sont semblables, seules les photos de biofilm formé après 48 h d'incubation dans les différents milieux sont affichées dans la figure 64.



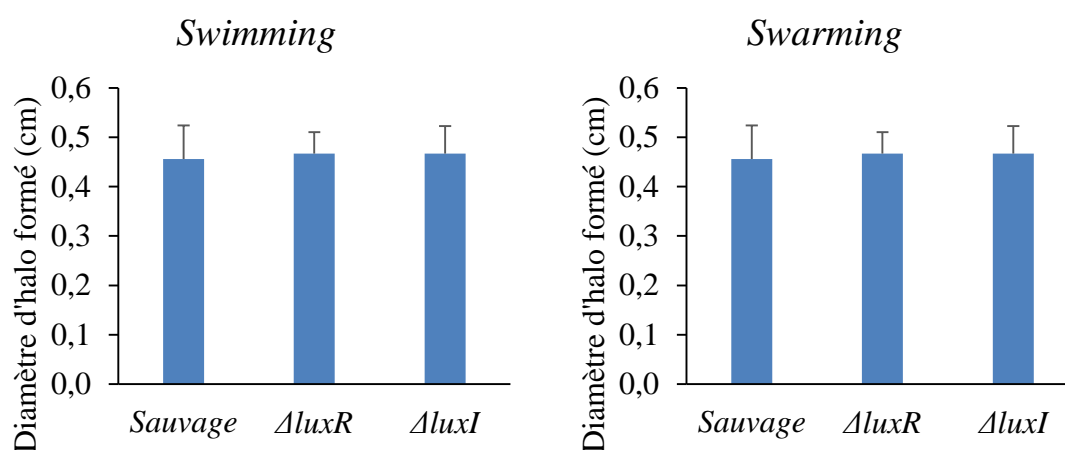
**Figure 64.** Effet des mutations et de l'ajout de C<sub>8</sub>-HSL sur la structure tridimensionnelle du biofilm formé par *S. woodyi* dans les milieux VNSS, MB et ASW à 48 h d'incubation.

Une culture de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en phase post exponentielle de croissance en VNSS ou MB a été diluée dans le même milieu pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Dans le cas d'ASW, une culture de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été centrifugée pendant 10 min à 6000 rpm et le culot a été resuspendu dans de l'ASW stérile puis dilué pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Les cultures obtenues dans les différents milieux ont été ensuite incubées à 20°C en conditions statiques dans des microplaques à 24 puits contenant une lamelle circulaire en verre par puit. Ensuite, 50 μM de C<sub>8</sub>-HSL ont été ajoutés sur des puits contenant de *S. woodyi*  $\Delta luxI$ . Après 48 h d'incubation, un marquage avec Syto9 à une concentration de 1,5 μM a été effectué et les photos du biofilm formé par *S. woodyi* ont été prises avec un logiciel connecté à un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 510) pour 3 champs différents de chaque lamelle.

Les résultats obtenus à la figure 64 confirment ceux qui ont été rapportés par les tests au CV. Premièrement, le biofilm formé dans ASW apparaît plus important et plus avancé dans son développement notamment par la formation de patchs bactériens régulièrement répartis sur la surface alors que ceux obtenus dans le milieu VNSS ou MB ne présentent aucun regroupement cellulaire spécifique mais une répartition homogène des bactéries sur la surface. Ceci vient corroborer les résultats obtenus en CV dans ce même milieu. Deuxièmement, aucune différence significative n'est observée au niveau du biofilm formé par *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$   $\Delta luxI$  ou  $\Delta luxI$  supplémenté par C<sub>8</sub>-HSL dans VNSS, MB ou ASW. Ceci confirme que la mutation du système AHL de *S. woodyi* n'affecte ni la quantité de biofilm formé, ni sa structure dans les conditions statiques testées dans cette étude.

#### 4.3.2. Effet d'inactivation de QS sur la mobilité de *S. woodyi*

La formation du biofilm sur une surface implique plusieurs étapes dont la colonisation est la clef de déclenchement des autres étapes (Ha and O'Toole, 2015). La colonisation nécessite d'abord un déplacement des bactéries vers la surface à coloniser. L'implication du QS dans le déplacement bactérien sur une surface a été rapportée chez plusieurs bactéries telles que *S. liquefaciens* qui colonise la surface grâce au *swarming*, un mode de déplacement régulé par le système AHL (Labbate *et al.*, 2004). Afin de vérifier si *S. woodyi* utilise le même mécanisme, des tests mettant en évidence la mobilité par *swarming* mais aussi par *swimming* ont été effectués sur la souche sauvage et les souches mutantes ( $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$ ) dans les deux milieux VNSS et MB. La figure 65 montre les résultats obtenus avec ces tests.



**Figure 65.** Effet des mutations sur le *swimming* et le *swarming* de *S. woodyi*.

Les diamètres des halos formés sur les boîtes de VNSS à 0,3% et à 0,5% agar pour les tests de *swimming* et *swarming*, respectivement ont été mesurés après 48 h d'incubation à 20°C. Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat.

La figure 65 montre le diamètre du halo formé par chaque souche après 48 h d'incubation à 20°C. Il faut noter que *S. woodyi* est une souche mobile (mobilité constatée par visualisation microscopique) ayant un flagelle polaire comme c'est le cas de la plupart des espèces appartenant au genre de *Shewanella* telles que *S. violacea* (Nogi *et al.*, 1998), *S. amazonensis* (Venkateswaran *et al.*, 1998) et *S. oneidensis* MR-1 (Paulick *et al.*, 2009). En se basant sur ces informations, les résultats affichés dans la figure 65 ne sont pas exploitables parce que le diamètre du halo formé normalement par une souche de *Shewanella* sur une boîte de *swimming* ou de *swarming* est beaucoup plus élevé que 0,4 cm (Paulick *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2011), le diamètre obtenu avec *S. woodyi* dans ces expériences sur le milieu VNSS. A noter que pareillement, un essai a été effectué sur des boîtes de VNSS à 0,25% agar et de MB à 0,25% ou 0,3% agar mais toujours le diamètre

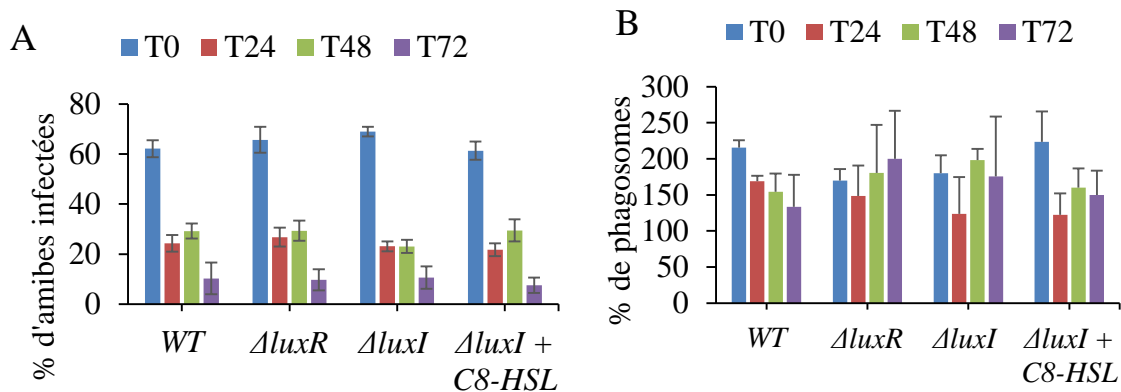
obtenu était de 0,4 cm. Au vu de ces expériences il apparaît que nous n'avons pas trouvé les bonnes conditions permettant de mesurer la mobilité de *S. woodyi*.

#### 4.4. QS et interaction bactéries-amibes

##### 4.4.1. Effet d'inactivation de QS sur l'interaction *S. woodyi* - *A. castellanii*

Les amibes sont des protozoaires appartenant à la classe de rhizopodes. *Acanthamoeba* est une amibe libre rencontrée dans tous types d'environnement et est souvent utilisée comme modèle dans les études d'interactions hôte-bactérie. Les amibes se nourrissent principalement de bactéries par phagocytose. *A. castellanii*, est connue pour sa capacité importante de phagocytose de bactéries mortes ou vivantes en milieu de culture liquide (Mogoa *et al.*, 2011), ce qui a permis de nombreuses études de ce phénomène (Essig *et al.*, 1997; Pukatzki *et al.*, 2002; Asghar *et al.*, 2012; Denet *et al.*, 2018). A la lumière des études faites, il est connu que le phénomène d'interaction entre les amibes et les bactéries n'aboutit pas toujours à la phagocytose et la digestion des bactéries. Par exemple, il a été rapporté que plusieurs bactéries pathogènes peuvent résister ou inhiber la fusion phagosome-lysosome responsable le plus souvent de la digestion bactérienne (Molmeret *et al.*, 2005). Celles-ci peuvent alors survivre et se répliquer au sein de l'amibe telles que *V. cholerae* (Matz *et al.*, 2005) *P. aeruginosa* (Pukatzki *et al.*, 2002), *Legionella pneumophila* (Tosetti *et al.*, 2014) et *Mycobacterium kansasii* (Goy *et al.*, 2007). Plusieurs stratégies de résistance ont été détectées telles que la synthèse de facteurs anti-protozoaires comme la protéase PrtV (Vaitkevicius *et al.*, 2008) par *V. cholerae* (Lutz *et al.*, 2013) et de la violacéine produite par plusieurs bactérie marine et terrestre comme *Pseudoalteromonas tunicata*, *P. ulvae* et *C. violaceum* (Matz, Webb, *et al.*, 2008). En plus, la synthèse de facteurs anti-protozoaires après l'ingestion des bactéries a été citée comme une stratégie utilisée par *P. aeruginosa* pour s'échapper de la digestion amibienne. Matz, Moreno *et al* ont déterminé en 2008 que cette bactérie est capable de tuer les amibes après ingestion en utilisant son système de sécrétion de type III (SST3) pour sécréter dans le cytoplasme amibien des effecteurs lui permettant de survivre tels que ExoU, ExoS et ExoT. ExoU est une cytotoxine puissante avec une activité phospholipase, ExoS et ExoT sont des enzymes qui inhibent la phagocytose en perturbant le cytosquelette amibien (Matz, Moreno, *et al.*, 2008). C'est le cas aussi de *L. pneumophila* qui utilise le système de sécrétion de type IV pour sécréter après ingestion, plus que 300 effecteurs lui permettant d'échapper au mécanisme de phagocytose (Hubber and Roy, 2010). Un de ces effecteurs est RavK qui perturbe le cytosquelette amibien en clivant l'actine (Liu *et al.*, 2017).

En outre, plusieurs auteurs ont rapporté le rôle de QS dans l'interaction amibes-bactéries où il a été démontré que l'interférence ou l'inactivation de QS d'une souche bactérienne la rend plus sensible à la phagocytose amibienne et moins virulente vis-à-vis de l'amibe (Pukatzki *et al.*, 2002; Erken *et al.*, 2011). C'est le cas de *P. aeruginosa* mutée au niveau de *lasR* codant pour le récepteur LasR (Pukatzki *et al.*, 2002) et de *V. cholerae* mutée au niveau de *hapR* codant pour le facteur transcriptionnel HapR impliqué dans la transduction des signaux QS chez cette bactérie (Erken *et al.*, 2011). Dans l'objectif de vérifier si le système QS est impliqué dans l'interaction de *S. woodyi* avec *A. castellanii*, des co-cultures de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  (en absence et en présence de C<sub>8</sub>-HSL) avec l'amibe *A. castellanii* ont été préparées et une observation au microscope à balayage laser confocal à T0, T24, T48 et T72 (après 3, 27, 51 et 75 h de mise en contact initiale) a été effectuée grâce à un marquage au Syto9. Les résultats montrent que la proportion d'amibes infectées ainsi que celle des phagosomes contenant des bactéries n'est pas modifiée selon qu'il s'agit de la souche sauvage ou des mutants, qu'il y ait ajout de C<sub>8</sub>-HSL ou non (Figure 66).



**Figure 66.** Effet des mutations sur l'interaction *S. woodyi* et *A. castellanii*.

Une culture en phase post exponentielle de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  ou  $\Delta luxI$  en VNSS a été centrifugée 10 min à 6000 rpm et récupérée dans du NSS. Les bactéries ont été ensuite ajoutées dans des microplaques de 24 puits contenant des amibes à une concentration de  $5 \times 10^5$  amibes/ml dans du NSS de sorte à avoir 100 fois plus de bactéries que d'amibes (MOI 100) et 50  $\mu$ M de C<sub>8</sub>-HSL ont été ajoutés ensuite sur des puits contenant *S. woodyi*  $\Delta luxI$ . Un marquage au Syto9 et une observation microscopique ont été effectués à T0, T24, T48 et T72 d'incubation à 20°C sans agitation.

A. Pourcentage d'amibes infectées par une ou plusieurs bactéries. B. Pourcentage de phagosomes

Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes souches testées concernant le pourcentage d'amibes infectées (Figure 66 A) et le pourcentage de phagosomes contenant des bactéries (Figure 66 B). Les résultats montrent qu'une ingestion et une digestion efficace de *S. woodyi* sauvage,  $\Delta luxR$  et  $\Delta luxI$  par *A. castellanii* est effectuée et que l'ajout de C<sub>8</sub>-HSL n'a aucun effet sur ces processus (Figure 66 A). Le pourcentage d'amibes infectées à T0 est d'environ 60% tandis qu'il est d'environ de 24% à T24 dans les 4 cas. Ceci



indique donc qu'une majorité des bactéries ingérées sont digérées dans les 24 premières heures d'incubation. À T72, le pourcentage diminue encore pour les trois souches pour atteindre une valeur de 10% environ. *S. woodyi* ne développe donc aucune résistance à l'ingestion ou à la digestion par *A. castellanii*. Par conséquent, *S. woodyi* est une bactérie sensible au broutage amibien et ne développe aucune forme de résistance ou de virulence contre *A. castellanii*. Le système QS impliquant les AHL n'intervient donc pas dans les processus d'interaction entre amibe et *S. woodyi*.

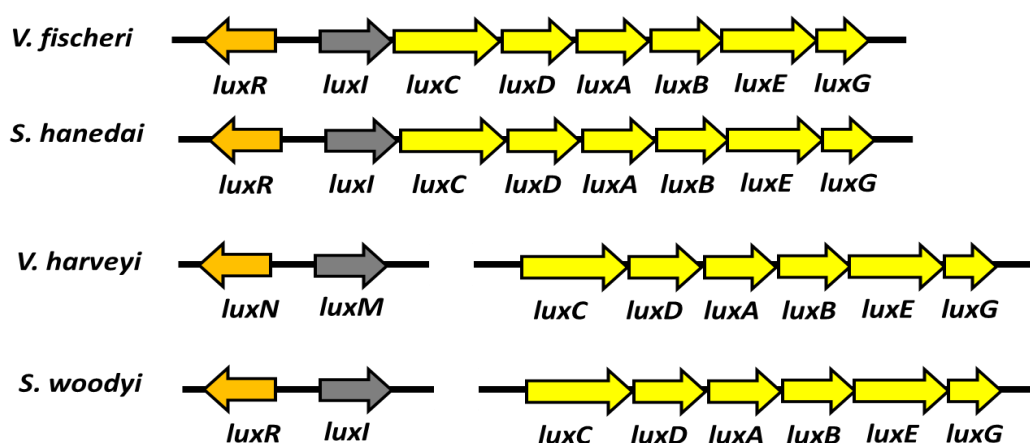
## 5. Conclusions et discussion

Dans cette partie de la thèse, il a été démontré que la bactérie marine *S. woodyi*, l'espèce luminescente du genre *Shewanella* isolée en 1997 à partir d'échantillons d'eau prélevés à une profondeur de 200 à 300 m dans la mer d'Alboran (Makemson *et al.*, 1997), utilise un système AHL de QS pour contrôler l'expression des gènes cibles impliqués dans sa luminescence. Comme dans le cas de la plupart des bactéries bioluminescentes telles que *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), *V. fischeri* (Egland and Greenberg, 1999) et *V. campbellii* (Liu Zhu *et al.*, 2012), dont la bioluminescence est contrôlée par l'expression des gènes organisés en opéron appelé *lux*. Un opéron *lux* a été déterminé dans cette étude chez *S. woodyi*. Cet opéron formé de 6 gènes, *luxCDABEG*, est présent dans le génome de cette bactérie à partir de Swoo\_3633 jusqu'à Swoo\_3638.

Dans le cas de *V. fischeri*, le premier gène dans l'opéron *lux* est le gène *luxI* (Asad and Opal, 2008), codant la synthèse de la molécule signal 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL. À partir d'un certain seuil de cette molécule signal, une réponse déclenchée par un facteur transcriptionnel LuxR, le récepteur de la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL, se forme dont la liaison de cette molécule avec le LuxR le stabilise et le rend capable après un changement de conformation de se fixer sur l'ADN à une séquence de 20 paires de bases inversement répétées appelées *lux box*, dans le promoteur de l'opéron *lux* (Kaplan and Greenberg, 1985). La fixation de l'ensemble 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL-LuxR sur les *lux box* active alors la transcription de l'opéron *lux* ainsi que le gène *luxR* situé à côté de cet opéron et régulé par le même promoteur. Ce qui se traduit par l'expression de la bioluminescence et la surexpression de la protéine synthase LuxI et donc une surproduction de la molécule signal 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL (boucle de rétroaction positive) ayant comme conséquence d'amplifier le phénomène de la bioluminescence via le QS.

Il a été démontré que le genre de *Shewanella* contenait deux bactéries luminescentes. Il s'agit de *S. hanedai* et *S. woodyi* (Makemson *et al.*, 1997). Sachant que *S. hanedai* présente une organisation génétique de l'opéron *lux* semblable à celle de *V. fischeri* (Peat and Adams, 2008), dans cette étude, il a été démontré que le mécanisme de la bioluminescence chez *S. woodyi* est QS dépendant et ressemble à ce de *V. fischeri* mais avec une organisation génétique différente (Figure 67). En effet, les gènes *luxI* et *luxR* (Swoo\_2998 et Swoo\_2297) sont retrouvés cote-à-côte dans le génome de *S. woodyi*, ils ne sont cependant pas localisés au même locus que l'opéron *lux* (Swoo\_3633 jusqu'à Swoo\_3638). Une séquence de 20 paires de bases inversement répétées a été trouvée à 180 et 60 bases en amont du site de départ de l'opéron *lux* (5'-ACCTGTTACATCGTACAGTT-3') et du gène *luxI* (5'-

CACTGTCCGATCGGACAGTA-3') respectivement, suggérant alors la régulation de ces gènes par le même facteur transcriptionnel. Ce profil trouvé chez *S. woodyi* n'est pas surprenant. Selon la littérature et comme montré dans la figure 66, deux profils chromosomiques de l'opéron *lux* sont identifiés chez les bactéries lumineuses ayant un système AHL de QS. La différence entre ces deux profils est la présence ou non des gènes codant la synthase et le récepteur d'AHL à côté de l'opéron *lux*.



**Figure 67.** Représentation schématique de deux profils de l'opéron *lux* rencontrés chez les bactéries lumineuses.

*luxR* ou *luxN* : gène codant le récepteur d'AHL. *luxI* ou *luxM* : gène codant la synthase d'AHL. *luxCDABEG* : opéron *lux* codant les protéines responsable de l'émission de la lumière.

Le rôle régulateur de LuxI comme producteur et de LuxR comme un facteur transcriptionnel récepteur d'AHL sur l'expression de l'opéron *lux* c-à-d la luminescence de *S. woodyi*, a été révélé suite à une mutation des gènes *luxI* et *luxR*. En fait, il a été démontré dans ce travail que la mutation au niveau de *luxI* ou *luxR* rend *S. woodyi* non lumineuse. L'utilisation de la RT-qPCR a permis de vérifier d'une part l'absence d'expression de l'opéron *lux* dans les souches *S. woodyi*  $\Delta luxI$  et *S. woodyi*  $\Delta luxR$  et de constater d'autre part le rôle régulateur de LuxR dans l'expression de *luxI* ainsi que la présence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre *luxI* et *luxR*. Aucune expression de *luxI* et de *luxR* n'a été observée dans les souches mutantes *luxR* et *luxI* respectivement, ce qui indique que la transcription de *luxI* est sous le contrôle de LuxR et qu'une boucle de rétrocontrôle positive débutant par LuxI permet la surexpression de LuxR.

Parmi les études disponibles concernant la caractérisation du système AHL chez les espèces appartenant au genre de *Shewanella* telles que *S. oneidensis* MR1 (Learman *et al.*, 2009), *S. baltica* (Zhu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017) et *S. putrefaciens* (Zhang *et al.*, 2017). Seule *S. baltica* a montré la capacité de produire des molécules d'AHLs comme la C<sub>10</sub>-HSL et la C<sub>8</sub>-HSL tandis qu'aucune molécule d'AHL n'a été détectée chez *S.*

*oneidensis* et *S. putrefaciens*. Afin de bien caractériser le système AHL contrôlant la luminescence de *S. woodyi*, des bactéries biosenseurs, *C. violaceum* CV026 et *A. tumefaciens* A136 qui détectent des AHLs à chaîne latérale courte et longue respectivement ainsi que la technique de LCMS qui permet de déterminer la structure de l'AHL synthétisée ont été utilisées (McClellan *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Ayé *et al.*, 2015). Les résultats ont montré que *S. woodyi* synthétise la C<sub>8</sub>-HSL. Ceci suggère une certaine diversité dans les systèmes QS présents au sein du genre *Shewanella*. C'est également le cas chez d'autres genres bactériens tels que *Vibrio* et *Pseudomonas*. Par exemple *V. harveyi* produit la 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL seulement (Henke and Bassler, 2004) tandis que *V. fischeri* produit la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL ainsi que la C<sub>8</sub>-HSL (Hanzelka *et al.*, 1999).

En se basant sur ces résultats, la capacité de la C<sub>8</sub>-HSL à induire la luminescence de *S. woodyi*  $\Delta luxI$  et à stimuler celle de *S. woodyi* sauvage a été testée. Il a été trouvé que cette molécule signal est capable de compléter la mutation *luxI* et de stimuler la luminescence de *S. woodyi* sauvage. Ce qui indique que *S. woodyi* contrôle sa luminescence par un système AHL qui met en jeu une molécule de C<sub>8</sub>-HSL synthétisée par LuxI et ayant LuxR comme récepteur. La figure 68 montre un modèle de ce système chez *S. woodyi*.

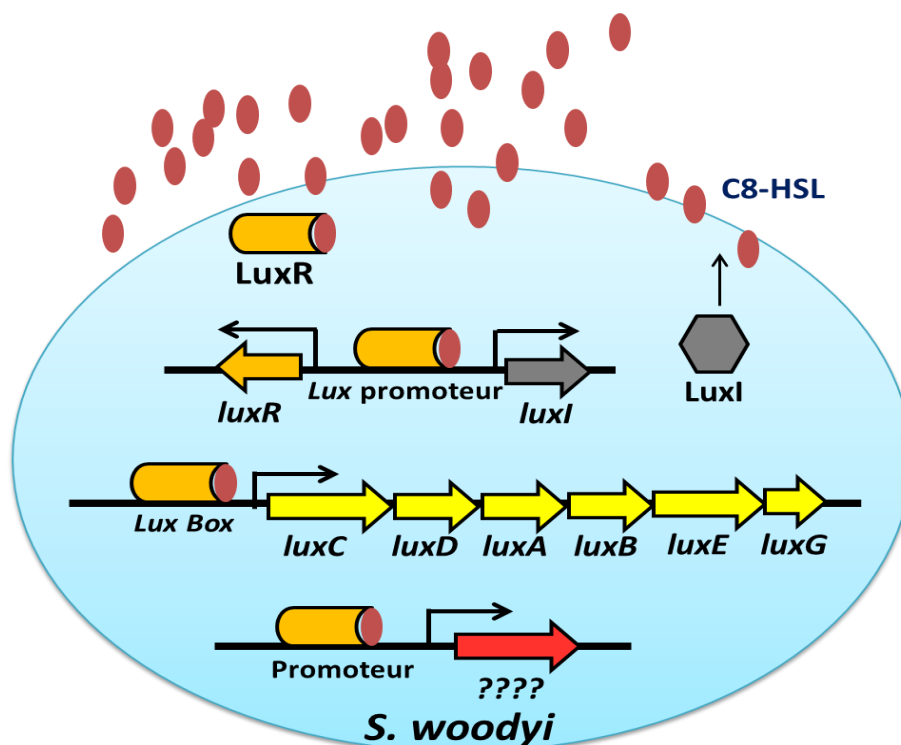
En plus, selon les AHLs reconnues par une protéine LuxR, deux classifications de cette dernière ont été établies. Les LuxR à large gamme de détection pouvant détecter plusieurs molécules d'AHLs et les LuxR spécifiques pouvant lier une seule molécule d'AHL qui dans la plupart des cas, est la même molécule que celle synthétisée par la bactérie contenant ce LuxR (Taga and Bassler, 2003; Ling *et al.*, 2009). Par exemple, RhlR, le récepteur de C<sub>4</sub>-HSL de *P. aeruginosa* est spécifique pour cette molécule signal synthétisée par la bactérie qui le possède (Winson *et al.*, 1998). Par contre le récepteur TraR, le LuxR homologue identifié chez *A. tumefaciens* est capable de reconnaître plusieurs molécules d'AHLs telles que les C<sub>6</sub>-HSL, C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL et C<sub>14</sub>-HSL (Zhu *et al.*, 1998; Dickschat, 2010). Dans ce travail, il a été déterminé que parmi les différentes molécules d'AHLs testées, seule la C<sub>8</sub>-HSL est capable de stimuler la luminescence de *S. woodyi* sauvage et d'induire celle de la souche *S. woodyi*  $\Delta luxI$  avec un effet dose dépendant. Ce qui indique que le LuxR contenant *S. woodyi* est spécifique pour la C<sub>8</sub>-HSL, la molécule signal synthétisée par cette bactérie. Alors *S. woodyi*  $\Delta luxI$  peut être utilisée comme une nouvelle bactérie biosenseur marine capable de détecter spécifiquement la C<sub>8</sub>-HSL sachant qu'aucun biosenseur spécifique à cette molécule n'a été développé à ce jour.

D'autre part, il a été démontré que le rôle de QS chez les bactéries luminescentes n'est pas exclusif à la régulation de la bioluminescence. Par exemple, le complexe 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL-LuxR régule un nombre important des gènes autres que ceux impliqués dans la production de la luminescence chez *V. fischeri*. Antunes *et al* ont montré que le QS, notamment le système LuxI/3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL/LuxR, régule l'expression de 30 gènes chez cette bactérie notamment des gènes codant pour des protéases et des peptidases nécessaires à la vie en symbiose de *V. fischeri* (Antunes *et al.*, 2007). De manière similaire, chez *V. harveyi*, le rôle du système AHL de QS dans la régulation de la virulence a été déterminé. L'inactivation de ce système diminue la virulence ainsi que la pathogénicité de *V. harveyi* contre une espèce de crevette, *Artemia franciscana* (Defoirdt *et al.*, 2008). En outre, selon Case *et al.*, des homologues LuxI/LuxR ont été identifiés dans plus de 100 espèces bactériennes à Gram négatif (Case *et al.*, 2008). Alors, comme le système AHL de QS n'est pas particulier aux bactéries luminescentes, divers rôles régulateurs de ce système ont été déterminés chez les différentes espèces bactériennes possédant un ou plusieurs systèmes AHL actifs. Par exemple, les deux systèmes LasI/3oxo-C<sub>12</sub>-HSL/LasR et RhII/C<sub>4</sub>-HSL/RhIR sont nécessaires pour la formation de biofilm mature ainsi que pour l'expression des facteurs de virulence tels que les rhamnolipides et la pyocyanine chez *P. aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1998; Waters and Bassler, 2005).

Dans cette étude, le rôle de système AHL dans l'adhésion ainsi que la formation du biofilm et la virulence de *S. woodyi* contre une espèce amibienne *A. castellanii* a été testé. Les résultats ont montré que la mutation au niveau des gènes codant pour la synthèse et le récepteur de C<sub>8</sub>-HSL, *luxI* et *luxR* respectivement, n'influe aucun de ces phénomènes notés ci-dessus. En plus, aucune molécule d'AHL y compris la C<sub>8</sub>-HSL ne modifie l'adhésion et la formation du biofilm par *S. woodyi* dans les conditions statiques testées. Ce qui suggère que la régulation de la formation du biofilm chez *S. woodyi* serait indépendante de son système AHL. Ce qui n'est pas le cas chez *S. baltica* 100 où il a été démontré que des molécules d'AHLs comme C<sub>8</sub>-HSL et C<sub>10</sub>-HSL peuvent stimuler la formation du biofilm (Wang *et al.*, 2017). En fait, la formation ou le développement du biofilm est un processus multifactoriel complexe qui est contrôlé par une combinaison de conditions environnementales et de fonctions cellulaires génétiquement contrôlées. La régulation génétique de la formation du biofilm offre toute seule une complexité étendue du fait de l'intervention de plusieurs réseaux ou signaux tels que le QS, le c-di-GMP et les petits ARN régulateurs dans la régulation des gènes impliqués dans ce processus. Pour cela, il peut être possible que la formation du biofilm

chez certaines espèces bactériennes est QS indépendante (Parsek and Greenberg, 2005). En plus, Liu *et al* ont montré en 2012 que le c-di-GMP régule directement la formation du biofilm chez *S. woodyi* dont la diminution de la concentration intracellulaire de ce second messenger a inhibé la formation du biofilm (Niu Liu *et al.*, 2012). Malgré qu'une interconnexion a été trouvée entre QS et c-di-GMP dans la régulation du biofilm chez plusieurs espèces bactériennes comme *V. cholerae* (Waters *et al.*, 2008) et *P. aeruginosa* (Cotter and Stibitz, 2007), un cas contraire a été observé chez d'autres bactéries comme *V. fischeri* (Bassis and Visick, 2010). Il apparaît que ces deux voies de signalisations cellulaires ne seront pas interconnectées chez *S. woodyi*.

En conclusion, une certaine diversité dans la régulation du biofilm chez les espèces appartenant au genre de *Shewanella* est présente. Sachant que le QS régule la formation du biofilm chez *S. baltica* 100 (Wang *et al.*, 2017), aucun système QS actif n'a été trouvé chez *S. oneidensis* (Learman *et al.*, 2009) où il a été rapporté que son biofilm est contrôlé par la c-di-GMP (Thormann *et al.*, 2006). Pareillement pour *S. woodyi*, le rôle de c-di-GMP dans la régulation du biofilm a été rapporté (Niu Liu *et al.*, 2012). Dans notre étude il a été démontré que le système AHL de *S. woodyi* n'a aucun effet régulateur sur son biofilm. Donc une compréhension de ces systèmes et de leur relation aidera à bien comprendre les comportements bactériens et donc comment contrôler certains de leurs phénotypes non désirés. A noter, comme le génome de *S. woodyi* est séquencé, une analyse transcriptomique semble être nécessaire pour identifier à l'échelle globale les gènes qui sont sous le contrôle du LuxR de *S. woodyi*. Ce qui permettra la compréhension complète de la régulation génétique via QS chez cette bactérie.



**Figure 68.** Modèle représentant le système AHL chez *S. woodyi*.

C<sub>8</sub>-HSL : Molécule signal, N-octanoyl-L-homosérine lactone. LuxI et LuxR: Protéine synthase et récepteur de C<sub>8</sub>-HSL respectivement. *luxCDABEG* : opéron *lux* codant les protéines responsables de l'émission de la bioluminescence. *Lux box* : région dans le promoteur de l'opéron *lux* auquel se fixe le complexe C<sub>8</sub>-HSL/LuxR. Flèche rouge : ensemble des gènes putatifs contrôlés par QS chez *S. woodyi*.

## 6. Références Bibliographiques

- Antunes, L.C.M., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B.R., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G., and Greenberg, E.P. (2007) Transcriptome Analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI Regulon. *J Bacteriol* **189**: 8387–8391.
- Asad, S., and Opal, S.M. (2008) Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care* **12**: 236.
- Asghar, A., Groth, M., Siol, O., Gaube, F., Enzensperger, C., Glöckner, G., and Winckler, T. (2012) Developmental gene regulation by an ancient intercellular communication system in social amoebae. *Protist* **163**: 25–37.
- Aye, A.M. (2015) Evidence of an AHL-based communication system quorum sensing in marine bacteria isolated from the Mediterranean Sea. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01233256>.
- Ayé, M.A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Koffi Nevry, R., *et al.* (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology* **161**: 2039–2051.
- Bagert, J.D., Kessel, J.C. van, Sweredoski, M.J., Feng, L., Hess, S., Bassler, B.L., and Tirrell, D.A. (2016) Time-resolved proteomic analysis of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Chem Sci* <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SC03340C>. Accessed February 17, 2016.
- Bassis, C.M., and Visick, K.L. (2010) The Cyclic-di-GMP Phosphodiesterase BinA Negatively Regulates Cellulose-Containing Biofilms in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **192**: 1269–1278.
- Case, R.J., Labbate, M., and Kjelleberg, S. (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* **2**: 345–349.
- Chai, Y., and Winans, S.C. (2004) Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol Microbiol* **51**: 765–776.
- Chellaram, C., Anand, T.P., Shanthini, C.F., Kumar, B.A., and Sarma, S.P. (2012) Bioactive peptides from epibiotic *Pseudoalteromonas* strain P1. *APCBEE Procedia* **2**: 37–42.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., and Glavina, D.R.T. (2008) Complete sequence of *Shewanella woodyi* ATCC 51908 Submitted (FEB-2008) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. .
- Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**: 17–23.
- Davey, M.E., and O’toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **64**: 847–867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295–298.



- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., and Iglewski, B.H. (2001) Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1865–1873.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2008) Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* **2**: 19.
- Denet, E., Vasselon, V., Burdin, B., Nazaret, S., and Favre-Bonté, S. (2018) Survival and growth of *Stenotrophomonas maltophilia* in free-living amoebae (FLA) and bacterial virulence properties. *PLOS ONE* **13**: e0192308.
- Dickschat, J.S. (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* **27**: 343.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., and Paul, V.J. (2011) Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**: 893–905.
- Dunne, W.M. (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev* **15**: 155–166.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol Microbiol* **31**: 1197–1204.
- Erken, M., Weitere, M., Kjelleberg, S., and McDougald, D. (2011) In situ grazing resistance of *Vibrio cholerae* in the marine environment. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 504–512.
- Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., and Marre, R. (1997) Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1396–1399.
- Fekete, A., Kuttler, C., Rothballer, M., Hense, B.A., Fischer, D., Buddrus-Schiemann, K., *et al.* (2010) Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 22–34.
- Gould, T.A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R.C., and Churchill, M.E.A. (2006) Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Synthases Examined by Mass Spectrometry. *J Bacteriol* **188**: 773–783.
- Goy, G., Thomas, V., Rimann, K., Jatou, K., Prod'homme, G., and Greub, G. (2007) The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Res Microbiol* **158**: 393–397.
- Ha, D.-G., and O'Toole, G.A. (2015) c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiol Spectr* **3** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498269/>.
- 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. *J Bacteriol* **181**: 5766–5770.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902–6914.

- Hubber, A., and Roy, C.R. (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 261–283.
- Jakobsen, T.H., Tolker-Nielsen, T., and Givskov, M. (2017) Bacterial Biofilm Control by Perturbation of Bacterial Signaling Processes. *Int J Mol Sci* **18** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618619/>. Accessed January 19, 2018.
- Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210–1214.
- Koutsoudis, M.D., Tsaltas, D., Minogue, T.D., and Bodman, S.B. von (2006) Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 5983–5988.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**: 692–698.
- Learman, D.R., Yi, H., Brown, S.D., Martin, S.L., Geesey, G.G., Stevens, A.M., and Hochella, M.F. (2009) Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in Biofilm Development and Sulfur Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1301–1307.
- Li, Z., and Nair, S.K. (2012) Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci* **21**: 1403–1417.
- Linares, D., Jean, N., Van Overtvelt, P., Ouidir, T., Hardouin, J., Blache, Y., and Molmeret, M. (2016) The marine bacteria *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 upregulates the type VI secretion system during early biofilm formation. *Environ Microbiol Rep* **8**: 110–121.
- Ling, E.A., Ellison, M.L., and Pesci, E.C. (2009) A novel plasmid for detection of N-acyl homoserine lactones. *Plasmid* **62**: 16–21.
- Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Boon, E.M. (2012) Nitric Oxide Regulation of Cyclic di-GMP Synthesis and Hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry (Mosc)* **51**: 2087–2099.
- Liu, Y., Zhu, W., Tan, Y., Nakayasu, E.S., Staiger, C.J., and Luo, Z.-Q. (2017) A *Legionella* Effector Disrupts Host Cytoskeletal Structure by Cleaving Actin. *PLoS Pathog* **13** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5298343/>. Accessed March 20, 2018.
- Liu, Z., Zhao, J., Liang, X., Li, K., Xiao, X., Zhu, J., *et al.* (2012) Characterization of luminescent *Vibrio campbellii* LZ5 and its potential application in the detection of environmental heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* **59**: 405–410.
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., and McDougald, D. (2013) Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol* **4** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3863721/>. Accessed February 7, 2018.
- Makemson, J.C., Fulayfil, N.R., Landry, W., Van Ert, L.M., Wimpee, C.F., Widder, E.A., and Case, J.F. (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**: 1034–1039.

- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H., and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16819–16824.
- Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *ISME J* **2**: 843–852.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., *et al.* (2008) Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *PLOS ONE* **3**: e2744.
- 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.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199.
- Mogoa, E., Bodet, C., Morel, F., Rodier, M.-H., Legube, B., and Héchard, Y. (2011) Cellular Response of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* to Chlorine, Chlorine Dioxide, and Monochloramine Treatments  $\nabla$ . *Appl Environ Microbiol* **77**: 4974–4980.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20–28.
- Nilsson, P., Olofsson, A., Fagerlind, M., Fagerström, T., Rice, S., Kjelleberg, S., and Steinberg, P. (2001) Kinetics of the AHL regulatory system in a model biofilm system: how many bacteria constitute a “quorum”? *J Mol Biol* **309**: 631–640.
- Nogi, Y., Kato, C., and Horikoshi, K. (1998) Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch Microbiol* **170**: 331–338.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27–33.
- Paulick, A., Koerdt, A., Lassak, J., Huntley, S., Wilms, I., Narberhaus, F., and Thormann, K.M. (2009) Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol* **71**: 836–850.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**: 5756–5767.
- Peat, S.M., and Adams, B.J. (2008) Natural selection on the luxA gene of bioluminescent bacteria. *SYMBIOSIS-REHOVOT* **46**: 101.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3159–3164.

- Reichelt, J.L., and Baumann, P. (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Für Mikrobiol* **94**: 283–330.
- Subramoni, S., Florez Salcedo, D.V., and Suarez-Moreno, Z.R. (2015) A bioinformatic survey of distribution, conservation, and probable functions of LuxR solo regulators in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **5**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4338825/>.
- Taga, M.E., and Bassler, B.L. (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 14549–14554.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., and Quirynen, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* **17**: 68–81.
- Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., and Spormann, A.M. (2006) Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**: 2681–2691.
- Tosetti, N., Croxatto, A., and Greub, G. (2014) Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. *Microb Pathog* **77**: 125–130.
- Tseng, B.S., Majerczyk, C.D., Passos da Silva, D., Chandler, J.R., Greenberg, E.P., and Parsek, M.R. (2016) Quorum Sensing Influences *Burkholderia thailandensis* Biofilm Development and Matrix Production. *J Bacteriol* **198**: 2643–2650.
- Vaitkevicius, K., Rompikuntal, P.K., Lindmark, B., Vaitkevicius, R., Song, T., and Wai, S.N. (2008) The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J* **275**: 3167–3177.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Jansen, A., Quintana, A. I., and Michiels, C. w. (2004) Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. *J Appl Microbiol* **96**: 177–184.
- Venkateswaran, K., Dollhopf, M.E., Aller, R., Stackebrandt, E., and Nealson, K.H. (1998) *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**: 965–972.
- Wang, Y., Zhang, X., Wang, C., Fu, L., Yi, Y., and Zhang, Y. (2017) Identification and Quantification of Acylated Homoserine Lactones in *Shewanella baltica*, the Specific Spoilage Organism of *Pseudosciaena crocea*, by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **65**: 4804–4810.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and Bassler, B.L. (2008) Quorum Sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* through Modulation of Cyclic Di-GMP Levels and Repression of *vpsT*. *J Bacteriol* **190**: 2527–2536.

- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jørgensen, F., Chhabra, S.R., *et al.* (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185–192.
- Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z., and Markowska, K. (2016) Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet* **57**: 225–238.
- Wu, L., Wang, J., Tang, P., Chen, H., and Gao, H. (2011) Genetic and Molecular Characterization of Flagellar Assembly in *Shewanella oneidensis*. *PLOS ONE* **6**: e21479.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., and Zhou, S. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1137–1144.
- Yuan, J., Wei, B., Shi, M., and Gao, H. (2011) Functional Assessment of EnvZ/OmpR Two-Component System in *Shewanella oneidensis*. *PLOS ONE* **6**: e23701.
- Zhang, C., Zhu, S., Jatt, A.-N., Pan, Y., and Zeng, M. (2017) Proteomic assessment of the role of N-acyl homoserine lactone in *Shewanella putrefaciens* spoilage. *Lett Appl Microbiol* **65**: 388–394.
- Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the Autoinducer 3-Oxo-octanoyl-Homoserine Lactone Strongly Inhibit Activity of the TraR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 5398–5405.
- Zhu, J., Zhao, A., Feng, L., and Gao, H. (2016) Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *Int J Food Microbiol* **217**: 146–155.
- Zhu, S., Wu, H., Zeng, M., Liu, Z., and Wang, Y. (2015) The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*. *Int J Food Microbiol* **192**: 26–33.

## *Chapitre IV*

### *Caractérisation du système AI2 de *S. woodyi* et test de molécules anti-QS*



## 1. Introduction

Dans le chapitre précédent, une caractérisation du système QS de type AHL de *S. woodyi* a été effectuée et nous avons démontré que *S. woodyi* a un système AHL actif, constitué d'une molécule signal, la C<sub>8</sub>-HSL, de la synthase LuxI et du récepteur LuxR. Ce système régule la luminescence de la bactérie mais ne semble pas impliqué dans la régulation de la mobilité, l'adhésion et la formation de biofilm. Comme l'AHL et l'AI2 sont les deux systèmes auto-inducteurs les plus répandus chez les bactéries à Gram- ([Bassler et al., 1997](#); [Xavier and Bassler, 2003](#)), nous avons cherché à caractériser également le système AI2 de *S. woodyi*.

Dans ce chapitre, deux stratégies ont été suivies afin de caractériser le système AI2 de *S. woodyi*. D'une part, la synthèse et la réception d'AI2 par *S. woodyi* ont été testées en utilisant la technique de bactéries biosenseurs et en testant l'effet de l'addition d'AI2 exogène sur la luminescence. D'autre part, nous avons cherché à savoir si des molécules commerciales identifiées comme des molécules inhibitrices du système AI2 pouvaient moduler la luminescence, l'adhésion et la formation de biofilm chez *S. woodyi*.

L'objectif à plus long terme est de constater, si elle existe, l'interconnexion entre les deux systèmes (AHL et AI2) d'une part, et de trouver d'autre part, des molécules QSI ciblant le système AI2 pour inhiber la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

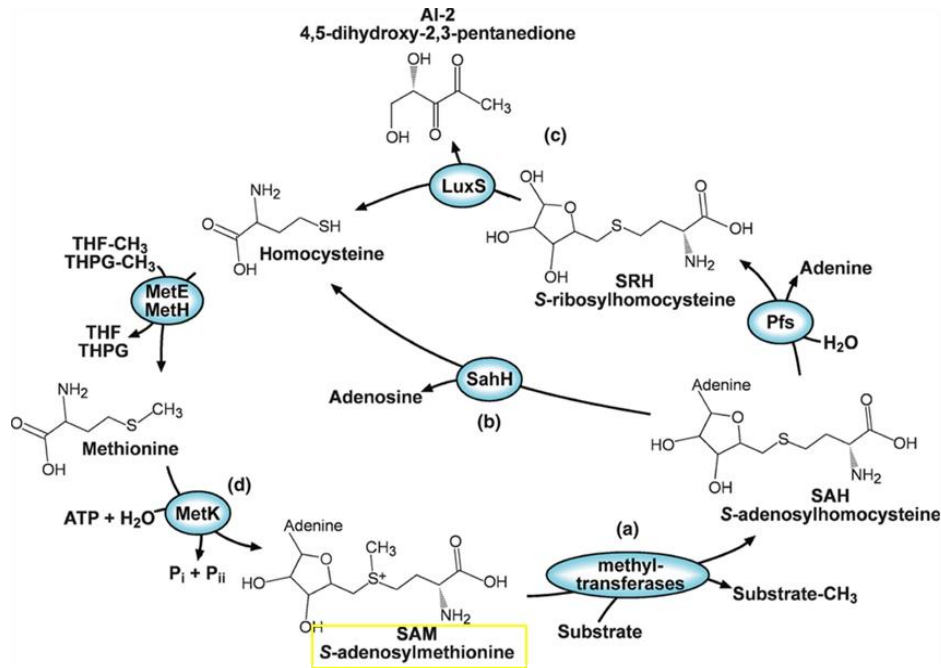


## 2. Caractérisation du système AI2 de *S. woodyi*

Comme dans le cas du système AHL, la caractérisation du système AI2 a débuté par la recherche dans le génome de *S. woodyi* MS32 (NC\_010506.1) des gènes *luxS* codant pour la synthèse d'AI2 et *luxPQ* ou *lsr* codant pour le récepteur d'AI2. Ensuite, la bactérie biosenseur AI2, *V. harveyi* MM32 (*luxN::Cm*, *luxS::Tn5 Kan*) a été utilisée pour tester *in vitro* la synthèse de cette molécule par *S. woodyi*. Finalement, la présence du récepteur AI2 a été testée expérimentalement par l'étude de l'effet de cette molécule signal sur la luminescence de *S. woodyi*.

### 2.1. Recherche des gènes impliqués dans la synthèse et la détection d'AI2 dans le génome de *S. woodyi* MS32

L'AI2 est une molécule signal identifiée à la fois chez les bactéries à Gram- et à Gram+ et est considéré comme un moyen de communication inter-espèces ou non spécifique du fait de la structure universelle de cette molécule chez toutes les bactéries qui la produisent (Xavier and Bassler, 2003). La synthèse d'AI2 par les cellules bactériennes se fait à partir du précurseur SAH sous l'action de deux enzymes, Pfs et LuxS qui sont respectivement une 5'-methyl-thioadenosine/S-adenosyl-homocysteine nucléosidase et une S-ribosyl-homocysteine lyase (Challan Belval *et al.*, 2006). Pfs et LuxS sont deux protéines appartenant à la famille d'enzymes impliqués dans le cycle de méthyle, un voie métabolique importante pour le recyclage du SAM, le principal donneur de méthyle dans la cellule (Schauder *et al.*, 2001). Le clivage du méthyle à partir du SAM donne naissance à un composé hautement toxique, le SAH qui est converti par Pfs en SRH, lui-même clivé ensuite par l'action de LuxS en homocystéine et AI2 (Figure 69). Il est à noter qu'une autre voie permettant la détoxification du SAH existe et implique l'enzyme SAHH (Rezzonico *et al.*, 2012) mais aucune bactérie ne semble posséder à la fois SAHH et LuxS (Xavier and Bassler, 2003).



**Figure 69.** L'AMC et la synthèse d'AI2 au sein d'une cellule bactérienne.

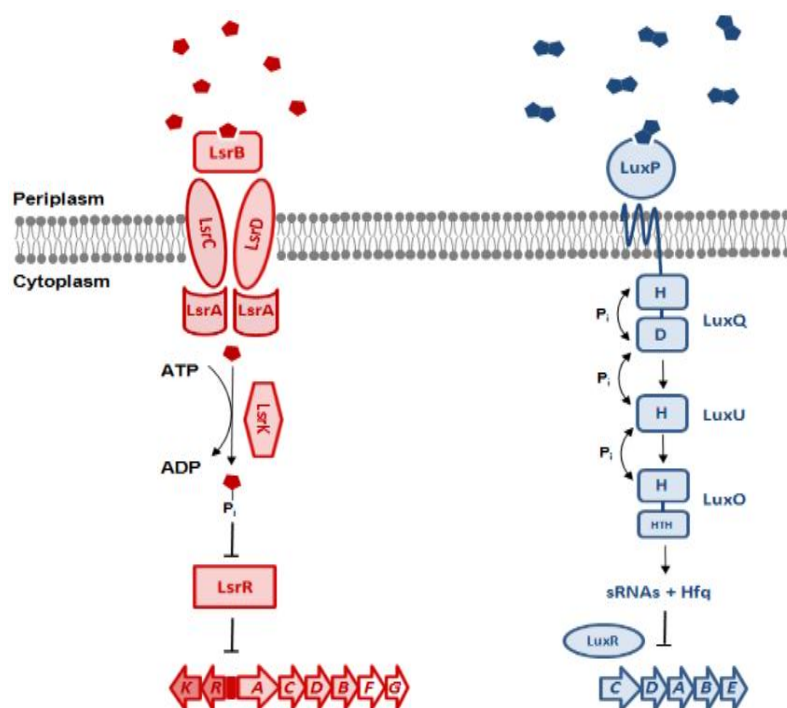
(a) Le transfert de méthyle à partir de SAM. (b) Clivage de SAH en homocystéine en une seule étape chez les organismes contenant une SAHH. (c) La synthèse d'AI2 à partir de SAH par l'action de Pfs et LuxS. (d) Régénération du SAM à partir d'homocystéine par une série des réactions impliquant une molécule de méthionine (Pereira *et al.*, 2013).

Afin de savoir si une synthèse d'AI2 par *S. woodyi* est possible, une recherche des gènes codants pour les protéines Pfs et LuxS a été effectuée en utilisant des bases de données comme NCBI et JGI (NC\_010506.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <https://genome.jgi.doe.gov>). Les résultats montrent que *S. woodyi* possède un gène Swoo\_1217 codant pour Pfs et un gène Swoo\_3618 codant pour LuxS. La comparaison de la séquence protéique de LuxS de *S. woodyi* avec des bases de données protéiques de type NCBI ou Uniprot (Altschul *et al.*, 1997) montre un pourcentage d'identité compris entre 72 et 89% de cette protéine avec d'autres LuxS appartenant à plus de 100 espèces bactériennes y compris plusieurs espèces de *Shewanella* et de *Vibrio* tels que *S. violacea*, *S. baltica*, *S. oneidensis*, *V. campbellii*, *V. cholerae* et *V. harveyi*. Ce résultat n'est pas surprenant, car selon Pereira *et al.*, des homologues de LuxS peuvent être identifiés dans 537 génomes bactériens sur 1402 séquencés (Pereira *et al.*, 2013). Ainsi, *S. woodyi* fait partie des bactéries contenant les gènes *pfs* et *luxS*, ce qui suggère qu'elle pourrait synthétiser la molécule signal AI2.

L'AI2, via le mécanisme de QS, a un rôle de régulateur de l'expression de gènes chez plusieurs espèces bactériennes. Il a été montré que l'AI2 est impliqué dans plusieurs mécanismes bactériens comme la luminescence chez *V. harveyi* et la pathogénicité chez *V. cholerae*, *E. coli* EHEC ou *Salmonella enterica*. Cependant, l'AI2 possède également un autre rôle puisque chez d'autres espèces, cette molécule est seulement un produit métabolique

secondaire de l'AMC du fait de l'implication de LuxS dans le métabolisme bactérien. Ainsi toute interférence avec LuxS pourrait entraîner des changements liés à la signalisation de type QS et/ou au métabolisme cellulaire (métabolisme de la méthionine, recyclage de l'homocystéine ou accumulation d'intermédiaires toxique comme le SAH) (Pereira *et al.*, 2013). Un des paramètres permettant de distinguer les deux situations, au sein d'une espèce bactérienne productrice d'AI2, est la présence, lorsque l'AI2 est impliqué dans le mécanisme de QS, d'un récepteur pouvant lier cette molécule et déclencher une modification de l'expression génétique à partir d'un certain seuil d'AI2.

À ce jour, deux types de récepteur AI2 ont été identifiés et caractérisés. Il s'agit de LuxP/Q, un système à deux composants identifié chez les *Vibrionaceae* (Henke and Bassler, 2004) et le transporteur de type ABC nommé Lsr, identifié chez les *Enterobacteriaceae* (Rezzonico *et al.*, 2012). Chez les *Vibrionaceae*, LuxP est le récepteur et LuxQ est une kinase qui suite à la liaison avec l'AI2 fonctionne comme une phosphatase et déphosphoryle une protéine nommée LuxU qui déphosphoryle à son tour une autre nommée LuxO. Cette dernière module la transcription des gènes cibles par la stabilisation indirecte de l'ARNm d'un facteur transcriptionnel nommé LuxR (Figure 70) (Henke and Bassler, 2004). Chez les *Enterobacteriaceae*, l'AI2 est internalisé au cytoplasme bactérien par le transporteur ABC où il est ensuite phosphorylé sous l'action d'une kinase nommée LsrK ce qui lui permet de se lier à un régulateur transcriptionnel nommé LsrR qui module à son tour l'expression des gènes cibles (Taga *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004) (Figure 70).



**Figure 70.** Transduction du signal AI-2 chez les *Enterobacteriaceae* (à gauche, en rouge) et les *Vibrionaceae* (à droite, en bleu) (Rezzonico *et al.*, 2012).

Dans le cas d'*Enterobacteriaceae*, l'AI2 est détecté par un transporteur ABC nommé Lsr qui la phosphoryle ce qui lui permet de se lier à un régulateur transcriptionnel nommé LsrR qui module à son tour l'expression de gènes cibles. Dans le cas des *Vibrionaceae*, l'AI2 est détecté par le récepteur LuxP/Q et suite à une chaîne de déphosphorylation, une régulation de la transcription des gènes cibles sera effectuée indirectement par LuxO.

Afin de déterminer la présence d'un gène codant pour l'un de ces deux récepteurs chez *S. woodyi*, une analyse génétique a été effectuée en utilisant des bases de données comme NCBI et JGI d'une part et des outils d'alignements protéiques comme Blast et Uniprot d'autre part.

Concernant le système LuxP/Q, l'analyse a été limitée aux deux protéines LuxP et LuxQ car elles sont les protéines responsables de la liaison et du déclenchement de la réponse chez les *Vibrionaceae*. Aucun homologue de LuxP (AAA20837.2) ou de LuxQ (AAA20838.1) n'a été trouvé chez *S. woodyi*.

Concernant le système Lsr, aucun homologue de LsrC (NP\_416031.1), LsrD (NP\_416032.1), LsrB (NP\_416033.1), LsrF (NP\_416034.1), LsrG (NP\_416035.1) ou LsrR (NP\_416029.1) n'a été trouvé. Par contre, des homologues ont été trouvés dans le cas de LsrA (NP\_416030.1) et LsrK. Ces deux protéines ne sont pas capables toutes seules de déclencher une réponse spécifique AI2. LsrA est un transporteur ABC et LsrK est une kinase. Ces deux protéines possèdent des domaines hautement conservés mais impliqués dans une très large gamme de fonctions, ce qui pourrait expliquer pourquoi des homologues de ces deux

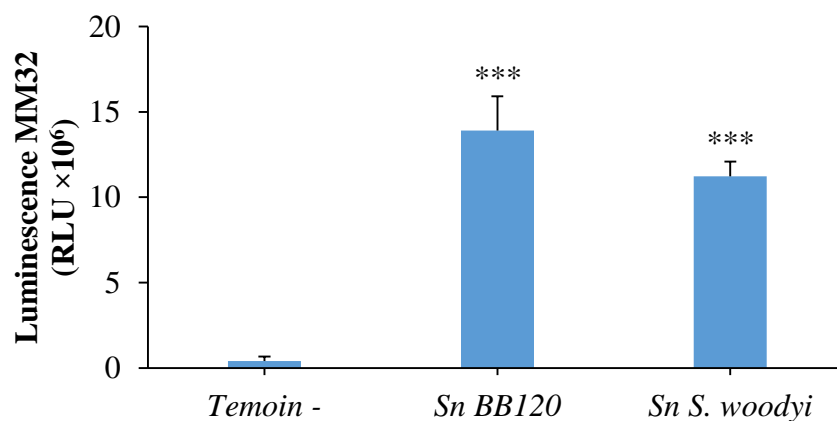
protéines ont été trouvés dans le génome de *S. woodyi*. De plus, sachant que les gènes de *lsr* sont organisés en opéron comme il est montré dans la figure 70, les gènes bordants les homologues *lsrA* et *lsrK* chez *S. woodyi* ont été analysés mais aucune organisation en opéron n'a été constatée.

Ainsi, il semble que *S. woodyi* pourrait synthétiser l'AI2 mais ne posséderait pas un récepteur connu pour cette molécule.

## 2.2. Synthèse et réception d'AI2 par *S. woodyi*

L'une des méthodes les plus connues pour vérifier la synthèse d'AI2 par une souche bactérienne est l'utilisation de la bactérie biosenseur *V. harveyi* BB170 (*luxN::Tn5 Kan*) ou MM32 (*luxN::Cm, luxS::Tn5 Kan*) (Miller *et al.*, 2004). Afin de valider l'hypothèse selon laquelle *S. woodyi* synthétiserait des molécules d'AI2, la capacité de *S. woodyi* à induire la luminescence de la souche biosenseur MM32 a été testée. Pour ce faire, l'effet d'un surnageant de *S. woodyi* contenant hypothétiquement des molécules d'AI2 a été testé sur la luminescence de *V. harveyi* MM32. En parallèle, la capacité de *S. woodyi* à réceptionner ou à interagir avec la molécule signal AI2 a été évaluée en testant l'effet d'addition d'AI2 exogène sur sa luminescence.

Les résultats concernant l'induction de la luminescence chez *V. harveyi* MM32 sont affichés dans la figure 71 suivante.



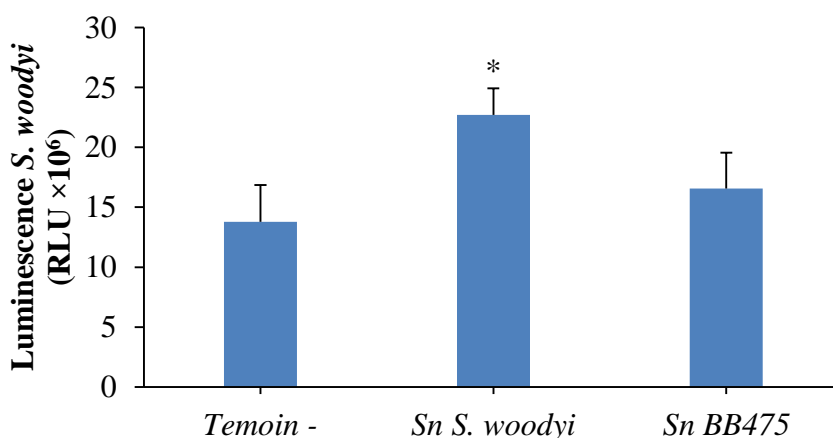
**Figure 71.** Activité LuxS de *S. woodyi*.

La luminescence de *V. harveyi* MM32 a été mesurée après 24 h d'incubation (30°C, 170 rpm) en présence de 10% v/v d'un milieu stérile (MB) utilisé comme témoin négatif, un surnageant de BB120 utilisé comme source d'AI2 exogène (témoin positif) et un surnageant de *S. woodyi*. Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les colonnes marquées par des astérisques sont significativement différentes (Bonferroni ;  $p < 0,001$ ) du témoin négatif.

La souche *V. harveyi* MM32 (*luxN::Cm, luxS::Tn5 Kan*) ne possède pas le récepteur de 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL (LuxN) et elle ne synthétise pas la molécule AI2. Cette souche est donc non

luminescente et émettra de la luminescence uniquement en cas de détection d'AI2 exogène. La figure 71 montre que la luminescence de MM32 reste nulle après 24 h d'incubation en présence du milieu MB stérile utilisé comme un control négatif. En revanche, une induction de la luminescence est observée en présence d'un surnageant de BB120 contenant l'AI2 utilisé comme un control positif (le surnageant de BB120 contient à la fois l'AI2 et le 3-OH-C<sub>4</sub>-HSL) et également en présence d'un surnageant de *S. woodyi*. Ce résultat indique que *S. woodyi* synthétise la molécule AI2, capable d'induire la luminescence de MM32.

La figure 72 présente l'effet de l'addition d'un surnageant de culture de la souche *V. harveyi* BB475 contenant l'AI2 sur la luminescence de *S. woodyi*. L'addition de MB stérile a servi de contrôle négatif dans cette expérience et le surnageant de *S. woodyi*, de contrôle positif.



**Figure 72.** Effet d'AI2 exogène sur la luminescence de *S. woodyi*.

La luminescence de *S. woodyi* a été mesurée après 15 h d'incubation (20°C, 120 rpm) en présence de 10% v/v d'un milieu stérile (MB) utilisé comme témoin négatif, un surnageant de *S. woodyi* utilisé comme témoin positif et un surnageant de BB475 utilisé comme source d'AI2 exogène. Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. La colonne marquée par des astérisques est significativement différente (Bonferroni ;  $p < 0,001$ ) du témoin négatif.

La figure 72 montre que le surnageant de *S. woodyi* stimule significativement la luminescence, cependant le surnageant de BB475 (production d'AI2) n'affecte pas la luminescence de *S. woodyi*. Ce résultat implique que la molécule AI2 n'a aucun effet sur la luminescence de *S. woodyi*. Ainsi, *S. woodyi* semble contrôler sa propre luminescence uniquement via son système AHL, plus précisément par le complexe C<sub>8</sub>-HSL/LuxR (Article, page 193). Afin de confirmer ce résultat il pourrait être utile de réaliser cette même expérience sur une souche de *S. woodyi* délétée du gène *luxI*. Cette souche est non luminescente donc toute induction putative de luminescence sera plus facilement observable que dans la souche de *S. woodyi* sauvage.

L'absence de gènes connus codant pour un récepteur d'AI2 et l'absence d'effet d'AI2 sur la luminescence de *S. woodyi* sont deux arguments suggérant l'absence d'un récepteur d'AI2 chez cette bactérie. Il semble donc que la protéine LuxS de *S. woodyi* est « seulement » impliquée dans le cycle de méthyle responsable de la régénération de la SAM, le donneur majeur de méthyl dans la cellule (Rezzonico and Duffy, 2008; Learman *et al.*, 2009). Pour confirmer ce résultat nous avons entrepris de déléter le gène *luxS*. Le même protocole que celui utilisé pour la délétion des gènes *luxR* ou *luxI* a été mis en place mais avec nettement moins de réussite. Par manque de temps nous avons dû abandonner la construction de ce mutant.

### 2.3. Conclusions et discussions

Le QS est un système de communication bactérien qui permet aux bactéries de réguler l'expression de gènes en réponse à un ou des signaux extracellulaires nommés auto-inducteur (Miller and Bassler, 2001). Cette communication a été considérée jusqu'à 1997 comme spécifique ou intra-espèce via l'auto-inducteur AHL identifié chez les bactéries à Gram-. En 1997, après la découverte du système AI2 comme un régulateur de la luminescence chez *V. harveyi*, Bassler *et al* ont déterminé que la luminescence d'une souche de *V. harveyi* mutante au niveau de son système AHL est induite par l'addition d'un surnageant de plusieurs espèces bactériennes (Bassler *et al.*, 1997). Ceci a amené les auteurs à suggérer que l'AI2 est une molécule de communication non spécifique ou inter-espèce.

Aujourd'hui, l'AI2 est considéré comme un signal de communication bactérien universel utilisé à la fois par les bactéries à Gram- et à Gram+ du fait de la présence de LuxS, l'enzyme responsable de la synthèse d'AI2, dans la plupart des génomes bactériens séquencés (Pereira *et al.*, 2013). L'implication de cette molécule signal dans la régulation de l'expression des gènes a été déterminée chez plusieurs espèces bactériennes, citons par exemple la luminescence chez *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), la virulence chez *S. enterica* (Jesudhasan *et al.*, 2010) et la formation du biofilm chez *E. coli* (Xavier and Bassler, 2005) et *S. gordonii* (McNab *et al.*, 2003). Comme dans le cas de l'AHL, un système AI2 typique et fonctionnel est constitué d'une synthase (LuxS), d'une molécule signal (AI2) et d'un récepteur. Deux types de ce dernier ont été identifiés et caractérisés dans la littérature, il s'agit de LuxPQ et Lsr (Pereira *et al.*, 2013), les récepteurs d'AI2 identifiés respectivement chez les *Vibrionaceae* tels que *V. harveyi* et les *Enterobacteriaceae* tels que *S. typhimurium*. Ces deux récepteurs semblent être exclusifs à ces deux classes bactériennes, aucun homologue n'a été identifié dans d'autres classes bactériennes.

LuxS est une S-ribosyl-homocysteine lyase impliquée dans l'AMC et responsable de la régénération de la méthionine et du SAM, le donneur majeur de méthyle dans la cellule bactérienne (Schauder *et al.*, 2001; Challan Belval *et al.*, 2006). Il est responsable de la détoxification de SAH, un produit métabolique hautement toxique, converti par l'action de Pfs en SRH qui est clivé ensuite par l'action de LuxS en homocystéine et AI2. Ceci explique alors la présence de LuxS dans la plupart des génomes bactériens séquencés dans la mesure où il est une enzyme importante et nécessaire pour les métabolismes cellulaires. Il est à noter qu'une enzyme nommé SAHH peut hydrolyser le SAH en adénosine et homocystéine en une



seule étape (Bodor *et al.*, 2008; Rezzonico *et al.*, 2012). Cette enzyme est présente généralement chez les Alphaprotéobactéries, donc les bactéries appartenant à cette classe ne peuvent pas synthétiser l'AI2 (Bodor *et al.*, 2008).

Selon la voie de détoxification de SAH, les bactéries sont divisées alors en deux types. Les bactéries ayant Pfs et LuxS et pouvant alors synthétiser l'AI2 et les bactéries non productrices d'AI2 qui ont SAHH (Xavier and Bassler, 2003). Il a été démontré que *S. woodyi* fait partie des bactéries productrices d'AI2, capable d'induire la luminescence de la souche biosenseur *V. harveyi* MM32, ce qui est le cas pour la plupart des bactéries appartenant à l'espèce *Shewanella* comme *S. oneidensis* (Learman *et al.*, 2009), *S. baltica* (Zhu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016), *S. frigidimarina* et *S. algae* (Bodor *et al.*, 2008). Chez *S. oneidensis*, la mutation de *luxS* induit une inhibition de la formation du biofilm. Cependant, l'addition d'AI2 exogène ne restaure pas le phénotype sauvage. Ce résultat indique que *S. oneidensis* est dépourvue d'un récepteur AI2 et que le rôle de LuxS chez cette bactérie est seulement métabolique (Learman *et al.*, 2009). De la même manière, aucun récepteur connu d'AI2 n'a été identifié chez *S. baltica* et l'addition d'AI2 exogène ne restaure pas l'effet d'une mutation *luxS* sur la détérioration des aliments chez cette bactérie (Zhu *et al.*, 2015). Notre étude a montré que l'AI2 ne semble pas influencer la luminescence de *S. woodyi* et aucun gène codant pour un récepteur d'AI2 n'a été trouvé dans le génome séquencé de cette bactérie (NC\_010506.1).

L'absence d'un homologue LuxP et Lsr chez une espèce bactérienne reste insuffisant pour confirmer que le système de QS de type AI2 est non fonctionnel chez cette espèce. Par exemple, l'addition d'AI2 exogène sur une culture d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ou de *Bacillus cereus* dépourvues d'un homologue LuxP ou Lsr, stimule la formation du biofilm (Auger *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Ceci indique qu'il existe d'autres récepteurs d'AI2 qui sont inconnus à ce jour. Une solution qui permet alors de confirmer l'absence d'un récepteur d'AI2 et qui permet en plus de différencier entre le rôle de LuxS dans le métabolisme cellulaire ou dans la voie du QS est la mutation de *luxS* puis la complémentation de la souche mutante par addition d'AI2 exogène. L'addition d'AI2 exogène sur une culture d'*Helicobacter pylori*  $\Delta luxS$  restaure la mobilité bactérienne sachant qu'aucun homologue LuxP ou Lsr n'a été identifié chez cette bactérie (Rader *et al.*, 2011). Ceci indique qu'un système AI2 fonctionnel est présent chez *Helicobacter pylori* possédant alors un récepteur d'AI2 différent de LuxP ou de Lsr. Une mutation de *luxS* chez *S. woodyi* semble alors être nécessaire pour déterminer la fonctionnalité du système AI2 chez cette bactérie.

### 3. Test de molécules anti-QS

#### 3.1. Introduction

En environnement marin, les biofilms formés sur des surfaces immergées influencent la colonisation ultérieure des biofilms par des algues ou d'autres organismes (Labbate *et al.*, 2004; You *et al.*, 2007; Dobretsov *et al.*, 2011). On parle alors de micro ou macro fouling (encrassement). Ce bio-fouling pose de sérieux problèmes économiques et environnementaux aux industries marines. En milieu marin, le phénomène de biofouling se retrouve évidemment sur les coques des bateaux, mais aussi sur de nombreuses autres structures comme les pipelines, les installations liées à l'aquaculture, les structures portuaires ou encore toutes sortes de matériels scientifiques immergés. Le cas des navires notamment a des conséquences tant d'un point de vue économique qu'écologique. En effet, la présence de biofouling sur les coques des navires augmente la rugosité de celles-ci et diminue alors leur hydrodynamisme, ce qui amène à une diminution de la vitesse de navigation et de la maniabilité (Yebra *et al.*, 2004). Pour y remédier, une augmentation de la vitesse de navigation s'avère nécessaire, ce qui conduit généralement à une élévation de la consommation de carburant. Cette consommation supplémentaire de carburant a pour conséquence une augmentation du coût opérationnel des navires et une émission élevée de composés nocifs et de déchets toxiques dans la mer et dans l'atmosphère (Yebra *et al.*, 2004; Schultz *et al.*, 2011). Pour lutter contre ce phénomène de biofouling, plusieurs stratégies antifouling (AF) ont été développées. Le principe est d'éliminer les organismes vivants qui se fixent sur les surfaces immergées grâce à la libération de substances nocives. Le principal inconvénient de ces stratégies est l'utilisation de substances toxiques ayant un impact négatif à la fois sur l'environnement et sur l'être humain comme le tributylétain (TBT) qui a un effet très toxique pour l'homme, directement par inhalation ou indirectement par ingestion de coquillages et pour l'environnement par perturbations hormonales chez les organismes vivants (Dafforn *et al.*, 2011). De plus, le développement d'une résistance bactérienne contre ces composés semble être non négligeable du fait de leur effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

Une nouvelle stratégie pour lutter contre la formation du biofilm (et du biofouling) a attiré les scientifiques ces dernières décennies. Il s'agit de l'utilisation de molécules non toxiques qui n'affectent pas la croissance bactérienne et ciblent le système de communication de type QS, du fait de l'implication de ce dernier, dans la régulation des gènes impliqués dans la formation du biofilm (Yeon *et al.*, 2009; Dobretsov *et al.*, 2009; Siddiqui *et al.*, 2012).

Cette stratégie a été appliquée non seulement en milieu marin mais aussi dans le secteur médical afin de prévenir la formation de biofilm et la virulence bactérienne contrôlés par le mécanisme de QS (LaSarre and Federle, 2013; Tang and Zhang, 2014; Asfour, 2017).

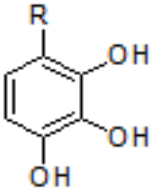
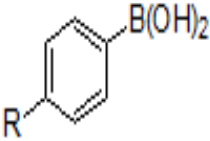
Sachant que des bactéries appartenant au genre *Shewanella* sont rencontrées dans la plupart des biofouling marins (Mieszkin *et al.*, 2013), un des objectifs de ce travail est de rechercher des molécules inhibitrices de la formation du biofilm chez *S. woodyi* par l'interférence avec l'un ou les deux systèmes de QS présents chez cette bactérie. Pour cela, dans ce présent chapitre, l'essai d'inhibition de biofilm chez *S. woodyi* par l'utilisation des molécules QSI commerciales appartenant à deux familles chimiques différentes est présenté.

### 3.2. Choix des molécules QSI

Il a été montré dans le chapitre précédent que *S. woodyi* possède un système AHL actif formé par LuxI, la C<sub>8</sub>-HSL et LuxR. Ce système contrôle l'expression de la bioluminescence mais pas l'adhésion et la formation du biofilm. Le deuxième système QS le plus étudié implique la molécule signal AI2, qui est considéré comme un signal de communication bactérien universel utilisé à la fois par les bactéries à Gram- et à Gram+ du fait de la présence de LuxS, l'enzyme responsable de la synthèse d'AI2, dans la plupart des génomes bactériens séquencés (Pereira *et al.*, 2013). Comme dans le cas de l'AHL, un système AI2 typique et fonctionnel est constitué d'une synthase (LuxS), d'une molécule signal (AI2) et d'un récepteur. Une étude chez *S. oneidensis* a été montrée qu'un mutant *luxS* affecte la formation de biofilm même si ce mécanisme est indépendant du QS (Learman *et al.*, 2009). Il est également à noter que LuxS peut être impliqué dans la synthèse d'AHLs de par son action sur la régénération du SAM, le donneur majeur de méthyle dans la cellule et le substrat de la synthèse d'AHL. Pour l'ensemble de ces raisons et parallèlement à la caractérisation du système QS de type AI2 explicité plus haut, nous avons choisi de tester l'effet de molécules décrites comme ciblant le système AI2, à la fois sur l'émission de luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm, avec le même objectif c-a-d évaluer si le système QS de type AI2 pouvait être impliqué dans l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*. Sachant que les molécules commerciales identifiées comme inhibitrices d'AI2 ne sont pas nombreuses, les choix ont été limités. Pour cela, 4 molécules appartenant à deux familles chimiques différentes ont été sélectionnées (Tableau 21). Il s'agit du 1,2,3-trihydroxy-benzène et du 2,3,4-trihydroxy-benzaldéhyde appartenant à la famille des pyrogallols, l'acide 4-méthyle-

phényle-boronique et l'acide 4-benzyloxy-phényle-boronique appartenant à la famille des acides boroniques.

**Tableau 21.** Les molécules QSI sélectionnées.

| Molécule (Appellation)                                                                                                                                                  | Structure                                                                          | Références                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1,2,3-trihydroxy-benzène ( <b>Mol 1</b> ) R = H<br>2,3,4 trihydroxybenzaldehyde ( <b>Mol 2</b> ) R = CHO                                                                |  | (Ni, Choudhary, <i>et al.</i> , 2008) |
| 4-Methoxycarbonylphenylboronic acid ( <b>Mol 3</b> )<br>R=CH <sub>3</sub> CO<br>4-(benzyloxy)phenylboronic acid ( <b>Mol 4</b> )<br>R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O |  | (Ni, Chou, <i>et al.</i> , 2008)      |

Les molécules de pyrogallol sont des composés polyphénoliques présents sont des métabolites végétaux naturels largement disponible dans les fruits, les légumes, les noix, les graines, les fleurs et l'écorce (Defoirdt *et al.*, 2013). Elles ont été rapportées comme des composés antioxydants possédant une activité antimicrobienne (Taguri *et al.*, 2006). Leur capacité à inhiber le QS bactérien a été rapportée par Ni *et al* en 2008. Dans cette étude, ils ont montré que ces molécules inhibent la luminescence de *V. harveyi* MM32 (*luxN*::Cm, *luxS*::Tn5 Kan) possédant un système AHL inactif avec une concentration plus petite que la CMI (Ni, Choudhary, *et al.*, 2008). En 2013, Defroid *et al* ont trouvé que le 1,2,3-trihydroxybenzène inhibe la luminescence ainsi que la virulence de la souche sauvage *V. harveyi* BB120 (Defoirdt *et al.*, 2013). L'effet de ces molécules sur le système QS de type AHL a été testé en 2017 par Hossain *et al.* en utilisant des souches de *C. violaceum* et de *P. aeruginosa* et aucune inhibition n'a été observée (Hossain *et al.*, 2017).

Les molécules d'acide boronique sélectionnées ont été synthétisées par Ni, Chou *et al* en 2008 en se basant sur la structure moléculaire d'AI2 contenant une molécule de borate. Selon les auteurs, ces composés sont des molécules qui miment l'AI2 et inhibent sa liaison au récepteur LuxP, conduisant ainsi à une inhibition du système AI2. L'efficacité de ces molécules à inhiber le système AI2 a été rapportée par les même auteurs en utilisant la souche *V. harveyi* MM32 (*luxN*::Cm, *luxS*::Tn5 Kan) (Ni, Chou, *et al.*, 2008). Les molécules d'acide boronique sont classées comme des inhibiteurs compétitifs d'AI2. Leur effet sur le système AHL de QS n'a pas été examiné à ce jour.

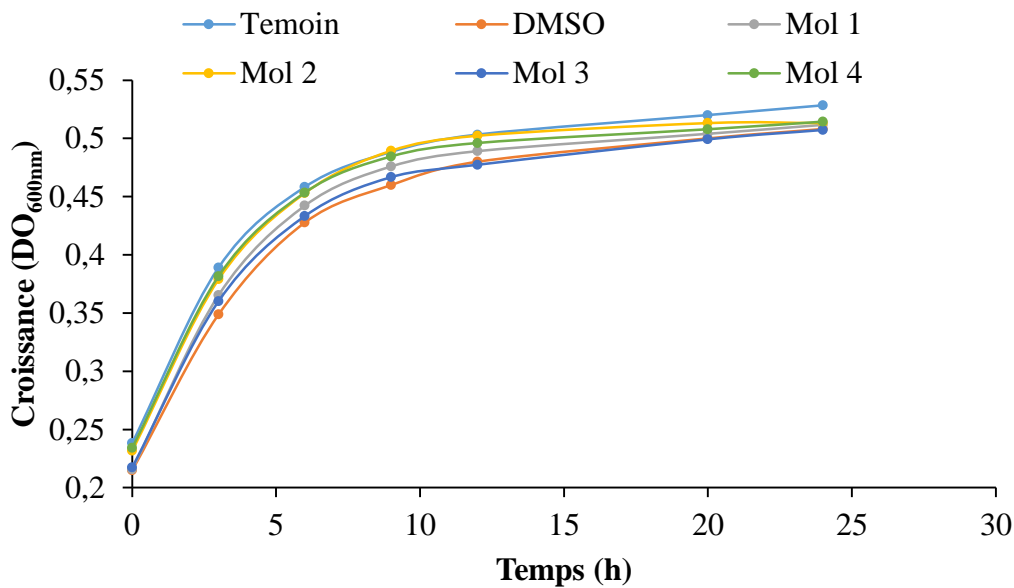
Le mode d'action de toutes ces molécules (pyrogallol, acides boroniques) est inconnu à ce jour.

### 3.3. Résultats

Sachant que le mode d'action de ces molécules est inconnu, elles étaient testées en même temps sur le biofilm, l'adhésion et la luminescence chez *S. woodyi*. Les résultats sont présentés dans les paragraphes ci-après.

#### Effet des molécules commerciales sur la croissance de *S. woodyi*

Les molécules commerciales sélectionnées ont tout d'abord été testées sur la croissance de *S. woodyi* afin de s'assurer qu'une éventuelle inhibition de la luminescence ou de la formation de biofilm ne soit pas une conséquence d'une inhibition de la croissance bactérienne (Figure 73).



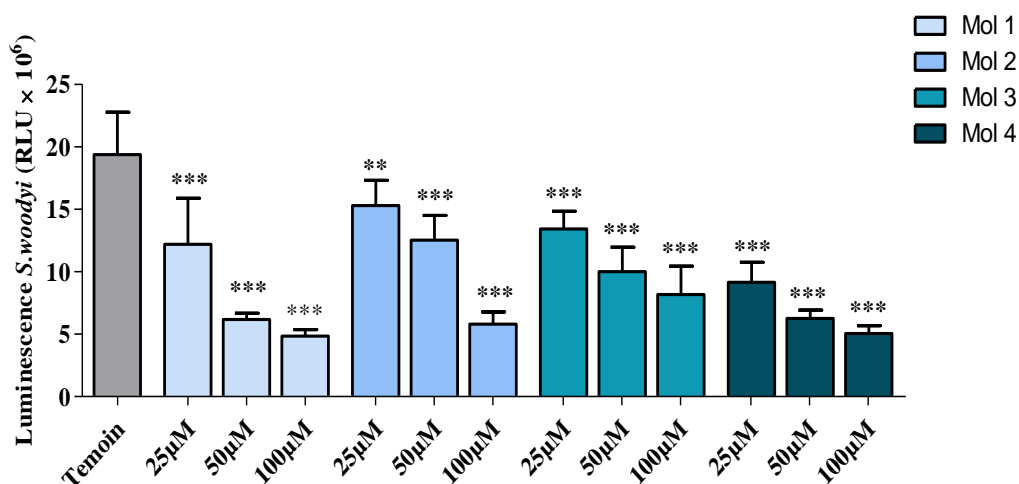
**Figure 73.** Effet des molécules commerciales utilisées sur la croissance de *S. woodyi*.

Une culture de *S. woodyi* dans du VNSS à une  $DO_{600nm}$  de 0,1 a été distribuée dans des puits de microplaques transparentes à 96 puits en absence (témoin) ou en présence de 10% v/v d'une molécule commerciale à une concentration de 100  $\mu M$  dissoute dans du VNSS à 1% DMSO. L'absorbance à 600 nm a été mesurée à différents temps de croissance en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro).

La figure 73 montre que les molécules commerciales testées n'affectent pas la croissance de *S. woodyi* à une concentration de 100  $\mu M$ . Aucune différence significative n'est observée en absence ou en présence des molécules sur la croissance bactérienne. Dans les expériences suivantes, les molécules seront donc utilisées à une concentration maximale de 100  $\mu M$ .

### Effet des molécules commerciales sur la luminescence

Après s'être assuré que les molécules utilisées n'affectent pas la croissance de *S. woodyi*, l'effet des molécules sur la luminescence a été testé. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 74.



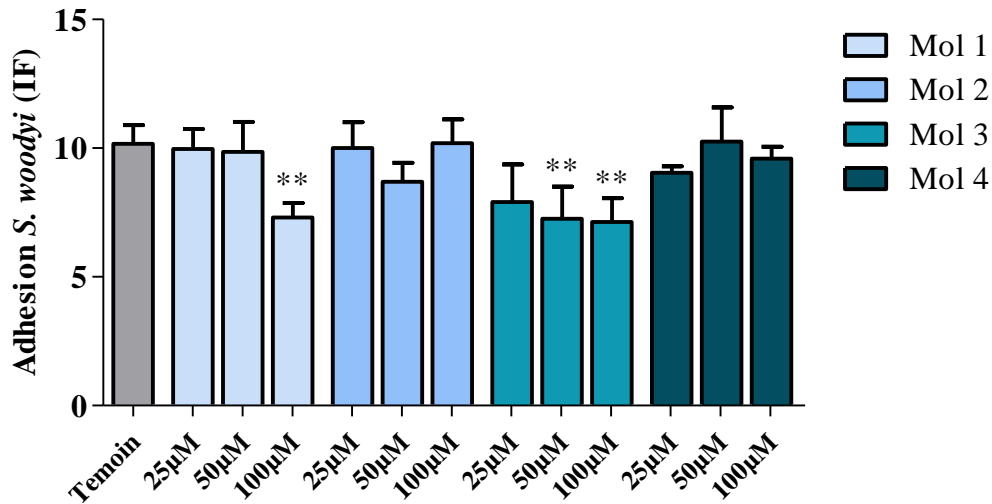
**Figure 74.** Effet des molécules commerciales utilisées sur la luminescence de *S. woodyi*.

Une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été distribuée dans des puits de microplaques blanches à 96 puits après un ajustement de la DO<sub>600nm</sub> à 0,3. Puis, 10% v/v des molécules commerciales ont été ajoutés dans les différents puits pour obtenir une concentration de 25, 50 ou 100 μM. De même, 10% v/v de VNSS à 1% DMSO ont été ajoutés dans les puits témoins. Les plaques ont été incubées sous agitation (120 rpm) à 20°C et la luminescence a été mesurée après 15 h d'incubation en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les conditions marquées d'astérisques sont significativement différentes du témoin (Bonferroni; \*\*\*: p < 0,001; \*\*: p<0.01; \*: p < 0,05).

La figure 74 montre que les molécules appartenant aux familles de pyrogallol et d'acide boronique (Mol 1, 2, 3 et 4) inhibent significativement la luminescence de *S. woodyi*. L'effet inhibiteur de ces molécules apparait dose dépendante puisque la luminescence diminue avec l'augmentation de la concentration de la molécule utilisée. Ceci indiquerait que les pyrogallols et les acides boroniques agiraient sur le système AHL de QS contrôlant la luminescence chez *S. woodyi*.

### Effet des molécules commerciales sur l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*

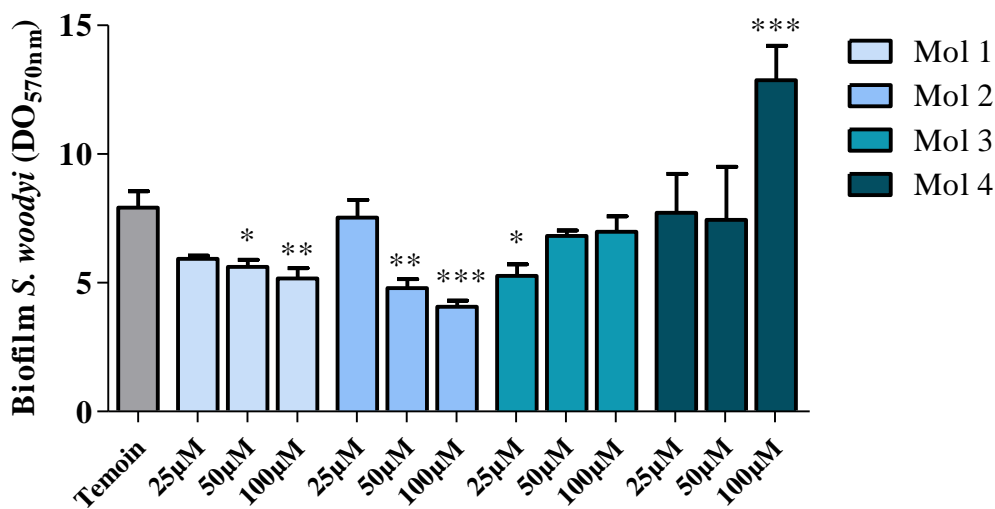
Les effets de molécules testées sur l'adhésion et la formation de biofilm chez *S. woodyi* sont présentés dans les Figures 75 et 76.



**Figure 75.** Effet des molécules de pyrogallol (Mol 1 et 2) et d'acide boronique (Mol 3 et 4) sur l'adhésion de *S. woodyi*.

Une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été centrifugée (6000 rpm pendant 10 min). Les cellules ont été récupérées en ASW puis distribuées dans des puits de microplaques noires à 96 puits après un ajustement de la  $DO_{600nm}$  à 0,3. Puis 10% v/v des molécules ont été ajoutés dans les différents puits pour obtenir une concentration de 25, 50 ou 100  $\mu M$ . Similairement, 10% v/v d'ASW à 1% DMSO ont été ajoutés dans les puits témoins. Les plaques ont été incubées sans agitation à 20°C pendant 15 h et l'adhésion a été évalué après un marquage au Syto9 par une mesure de fluorescence ( $\lambda_{ex}=475nm$ ,  $\lambda_{em}=510nm$ ) en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les conditions marquées par des astérisques sont significativement différentes du témoin (Bonferroni; \*\* : $p<0.01$ ).

La figure 75 montre que les molécules qui ont présenté un effet inhibiteur sur la luminescence de *S. woodyi* n'agissent pas efficacement sur l'adhésion puisque seules les molécules 1 et 3 montrent un effet inhibiteur faible au-delà d'une concentration de 100  $\mu M$  et de 50  $\mu M$  respectivement.



**Figure 76.** Effet des Molécules de pyrogallol (Mol 1 et 2) et d'acide boronique (Mol 3 et 4) sur la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

Une culture de *S. woodyi* en phase post exponentielle de croissance en VNSS a été centrifugée (6000 rpm pendant 10 min). Les cellules ont été récupérées en ASW puis distribuées dans des puits de microplaque

transparente à 96 puits après un ajustement de la DO<sub>600nm</sub> à 0,5. Puis, 10% v/v des molécules ont été ajoutés dans les différents puits pour obtenir une concentration de 25, 50 ou 100 µM. Similairement, 10% v/v d'ASW à 1% DMSO ont été ajoutés dans les puits témoins. Les plaques ont été incubées sans agitation à 20°C pendant 15 h et la formation du biofilm a été quantifiée après un marquage au CV par une mesure d'absorbance à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaque (TECAN, Infinite M 200 pro). Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicat. Les conditions marquées d'astérisques sont significativement différentes du témoin Bonferroni; \*\*\*: p < 0,001; \*\*: p < 0,01; \*: p < 0,05).

La figure 76 montre que les deux molécules appartenant à la famille de pyrogallol (Mol 1 et 2) inhibent la formation du biofilm chez *S. woodyi* au-delà d'une concentration de 50 µM. Ceci indiquerait que la Mol 2 pourrait inhiber la formation du biofilm sans agir sur l'adhésion et qu'une inhibition de l'adhésion par la Mol 1 amènerait à une inhibition du biofilm. Par contre, la Mol 3 inhibe la formation du biofilm seulement à une concentration de 25 µM et la Mol 4 l'augmente à une concentration de 100 µM.

Le tableau 22 récapitule l'effet des molécules 1, 2, 3 et 4 sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

**Tableau 22.** Effet des molécules appartenant aux familles de pyrogallol et d'acide boronique sur la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

| Molécules                                 | Concentration (µM) | Effet inhibiteur sur |            |            |
|-------------------------------------------|--------------------|----------------------|------------|------------|
|                                           |                    | La luminescence      | L'adhésion | Le biofilm |
| 1,2,3-trihydroxy-benzène<br>(Mol 1)       | 25                 | ***                  | 0          | 0          |
|                                           | 50                 | ***                  | 0          | *          |
|                                           | 100                | ***                  | **         | **         |
| 2,3,4 trihydroxybenzaldehyde<br>(Mol 2)   | 25                 | **                   | 0          | 0          |
|                                           | 50                 | ***                  | 0          | **         |
|                                           | 100                | ***                  | 0          | ***        |
| Methoxycarbonylphenylboronic acid (Mol 3) | 25                 | ***                  | 0          | *          |
|                                           | 50                 | ***                  | **         | 0          |
|                                           | 100                | ***                  | **         | 0          |
| 4-(benzyloxy) phenylboronic acid (Mol 4)  | 25                 | ***                  | 0          | 0          |
|                                           | 50                 | ***                  | 0          | 0          |



|  |     |     |   |     |
|--|-----|-----|---|-----|
|  | 100 | *** | 0 | +++ |
|--|-----|-----|---|-----|

\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$

+++ : effet stimulateur avec un  $p < 0,001$

0 : Pas d'effet

Coloration jaune : effet inhibiteur sur les 3 phénotypes

Le but de cette partie de la thèse a été de trouver des molécules QSI qui peuvent inhiber à la fois l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi* sans affecter sa croissance. Les résultats de ces tests confirment qu'il est difficile d'établir une relation entre QS, adhésion et formation du biofilm chez *S. woodyi* MS32 comme le suggère les résultats obtenus dans le chapitre précédent. Parmi les molécules testées, seul le pyrogallol (Mol 1) présente un effet inhibiteur à la fois sur le QS (la luminescence), l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*.

### 3.4. Conclusion

Du fait de l'implication du QS dans de nombreux processus bactériens nuisibles pour l'homme et l'activité humaine dans l'environnement tels que la formation du biofilm, la synthèse des facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques, plusieurs stratégies ont été développées dans le but d'interférer avec celui-ci afin d'inhiber les processus qu'il contrôle (Defoirdt *et al.*, 2008; Kalia, 2013; Lade *et al.*, 2014).

Dans cette partie de thèse, des molécules commerciales identifiées comme inhibitrices de système AI2 de QS, appartenant aux deux familles chimiques différentes, pyrogallol et acide boronique, ont été testées sur la luminescence, l'adhésion et le biofilm chez *S. woodyi*. Seules les molécules de pyrogallol, 1,2,3-trihydroxy-benzène et 2,3,4-trihydroxy-benzaldéhyde ont présentés un effet inhibiteur à la fois sur la luminescence et la formation de biofilm. Il est à noter que le mode d'action de ces molécules chez les différentes espèces de *Vibrio* testées comme chez *S. woodyi* reste hypothétique et a besoin de plus de caractérisation.

## 4. Références Bibliographiques

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Asfour, H.Z. (2017) Antiquorum sensing natural compounds. *J Microsc Ultrastruct* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213879X16300797>.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., and Gohar, M. (2006) Autoinducer 2 Affects Biofilm Formation by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 937–941.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043–4045.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **179**: 4043–4045.
- Bodor, A., Elxnat, B., Thiel, V., Schulz, S., and Wagner-Döbler, I. (2008) Potential for luxS related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC Microbiol* **8**: 13.
- Challan Belval, S., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., and Guzzo, J. (2006) Assessment of the Roles of LuxS, S-Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in Cell Attachment during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2644–2650.
- Dafforn, K.A., Lewis, J.A., and Johnston, E.L. (2011) Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar Pollut Bull* **62**: 453–465.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. (2008) Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* **2**: 19.
- Defoirdt, T., Pande, G.S.J., Baruah, K., and Bossier, P. (2013) The Apparent Quorum-Sensing Inhibitory Activity of Pyrogallol Is a Side Effect of Peroxide Production. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2870–2873.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., and Paul, V.J. (2011) Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**: 893–905.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., and Paul, V. (2009) Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**: 413–427.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902–6914.
- Hossain, M.A., Lee, S.-J., Park, N.-H., Mechesso, A.F., Birhanu, B.T., Kang, J., *et al.* (2017) Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Sci Rep* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587592/>. Accessed January 9, 2018.

- Jesudhasan, P.R., Cepeda, M.L., Widmer, K., Dowd, S.E., Soni, K.A., Hume, M.E., *et al.* (2010) Transcriptome Analysis of Genes Controlled by luxS/Autoinducer-2 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis* **7**: 399–410.
- Kalia, V.C. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* **31**: 224–245.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**: 692–698.
- Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. (2014) Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *Int J Biol Sci* **10**: 550–565.
- LaSarre, B., and Federle, M.J. (2013) Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 73–111.
- Learman, D.R., Yi, H., Brown, S.D., Martin, S.L., Geesey, G.G., Stevens, A.M., and Hochella, M.F. (2009) Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in Biofilm Development and Sulfur Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1301–1307.
- Li, L., Xu, Z., Zhou, Y., Li, T., Sun, L., Chen, H., and Zhou, R. (2011) Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microb Pathog* **50**: 293–302.
- McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S., and Lamont, R.J. (2003) LuxS-Based Signaling in *Streptococcus gordonii*: Autoinducer 2 Controls Carbohydrate Metabolism and Biofilm Formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **185**: 274–284.
- Mieszkin, S., Callow, M.E., and Callow, J.A. (2013) Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. *Biofouling* **29**: 1097–1113.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199.
- Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2004) *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol Cell* **15**: 677–687.
- Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., Lu, C.-D., Tai, P.C., and Wang, B. (2008) Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 590–594.
- Ni, N., Choudhary, G., Li, M., and Wang, B. (2008) Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 1567–1572.
- Pereira, C.S., Thompson, J.A., and Xavier, K.B. (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 156–181.
- Rader, B.A., Wreden, C., Hicks, K.G., Sweeney, E.G., Ottemann, K.M., and Guillemin, K. (2011) *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiol Read Engl* **157**: 2445–2455.

- Rezzonico, F., and Duffy, B. (2008) Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for luxS in most bacteria. *BMC Microbiol* **8**: 154.
- Rezzonico, F., Smits, T.H.M., and Duffy, B. (2012) Detection of AI-2 Receptors in Genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosystems. *Sensors* **12**: 6645–6665.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**: 463–476.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., and Hertel, W.M. (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**: 87–98.
- Siddiqui, M.F., Sakinah, M., Singh, L., and Zularisam, A.W. (2012) Targeting N-acyl-homoserine-lactones to mitigate membrane biofouling based on quorum sensing using a biofouling reducer. *J Biotechnol* **161**: 190–197.
- Taga, M.E., Miller, S.T., and Bassler, B.L. (2003) Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **50**: 1411–1427.
- Taguri, T., Tanaka, T., and Kouno, I. (2006) Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull* **29**: 2226–2235.
- Tang, K., and Zhang, X.-H. (2014) Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar Drugs* **12**: 3245–3282.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**: 191–197.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2005) Regulation of Uptake and Processing of the Quorum-Sensing Autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 238–248.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* **50**: 75–104.
- Yeon, K.-M., Cheong, W.-S., Oh, H.-S., Lee, W.-N., Hwang, B.-K., Lee, C.-H., *et al.* (2009) Quorum Sensing: A New Biofouling Control Paradigm in a Membrane Bioreactor for Advanced Wastewater Treatment. *Environ Sci Technol* **43**: 380–385.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., and Zhou, S. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1137–1144.
- Zhao, A., Zhu, J., Ye, X., Ge, Y., and Li, J. (2016) Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Food Microbiol* **230**: 73–80.
- Zhu, J., Zhao, A., Feng, L., and Gao, H. (2016) Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *Int J Food Microbiol* **217**: 146–155.

Zhu, S., Wu, H., Zeng, M., Liu, Z., and Wang, Y. (2015) The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*. *Int J Food Microbiol* **192**: 26–33.



## *Conclusion générale*





## 1. Conclusion générale

Les bactéries sont des organismes largement étudiés dans le monde vivant, le nombre des bactéries sur la planète a été estimé en 1998 à environ  $5 \times 10^{30}$  cellules. Dans l'environnement marin, la concentration des bactéries est estimée à  $5 \times 10^5$  cellules bactériennes par millilitre d'eau de mer (Whitman *et al.*, 1998). Mis à part de leur myriade de fonctions bénéfiques pour l'être humain comme le recyclage des nutriments, la décomposition des déchets et leur implication dans des nombreux cycles biogéochimiques, les bactéries constituent également une source des problèmes pour l'homme et ses activités dans l'environnement. Citons par exemple la formation du biofilm et laviulence dont sont pourvues certaines bactéries tels que *V. cholerae*, *Salmonella* spp, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Shigella* spp qui provoqueraient des maladies létales. Le biofilm bactérien défini comme une agrégation des bactéries sur une surface inerte ou biotique (Watnick and Kolter, 2000; Kolter and Greenberg, 2006) est un processus hautement régulé génétiquement. Un des principaux régulateurs connus à ce jour est le Quorum Sensing (QS) (Wolska *et al.*, 2016).

En milieu marin, le biofilm constitué de microorganismes précède la colonisation des surfaces par des macroorganismes aboutissant à la formation de biofouling, à l'origine des nombreux effets néfastes pour l'homme et l'environnement. L'exemple type de ce phénomène est l'augmentation des coûts opérationnels ainsi que de la pollution environnementale due à la présence de biofouling sur les coques des navires. Les revêtements peinture des coques incluent encore aujourd'hui des éléments toxiques qui sont relargués dans la mer et s'accumulent dans la chaîne alimentaire. Afin de remplacer les biocides présents dans ces peintures antifouling, une des stratégies serait d'y inclure des cocktails de molécules à large spectre, non toxiques et respectueuses de l'environnement qui pourraient limiter le développement du biofilm, la partie du biofouling la plus difficile à éliminer (ou à nettoyer). Ces cocktails de molécules pourraient intégrer des molécules telles que celles ciblant le QS.

En effet, de multiples études montrent que le QS est impliqué dans des nombreux processus bactériens tels que la synthèse des facteurs de virulence, la bioluminescence mais aussi le biofilm (LaSarre and Federle, 2013). Jusqu'à ce jour le QS a presque toujours été associé à l'émission de luminescence chez les bactéries (England and Greenberg, 1999; Henke and Bassler, 2004). Bien que les bactéries luminescentes soient abondantes dans le milieu marin (Reichelt and Baumann, 1973), seuls les mécanismes impliqués dans la luminescence

de quelques espèces ont été décrits de façons plus précises comme ceux de *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004), *V. fischeri* (Egland and Greenberg, 1999) et de *V. campbellii* (Liu Zhu *et al.*, 2012). Une certaine diversité dans les systèmes QS présents au sein des *Shewanella* et de leur implication potentielle dans le biofilm semble exister (Learman *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Puisque *Shewanella woodyi* est une bactérie marine luminescente dont le génome est séquencé et qu'aucune étude n'a été publiée à ce jour sur la caractérisation du système QS chez une bactérie luminescente appartenant au genre *Shewanella*, l'essentiel des études publiées étant concentrées sur le genre *Vibrio* (Henke and Bassler, 2004; Antunes *et al.*, 2007). Le premier objectif était donc de vérifier que la luminescence, comme chez la plupart de ces bactéries est bien sous le control du QS chez *S. woodyi*. Le deuxième objectif est d'étudier le lien, s'il existe, entre QS et formation du biofilm chez cette bactérie. Plus précisément, ce travail a consisté en la caractérisation des systèmes AHL et AI2 chez *S. woodyi* et d'éventuellement rechercher des molécules inhibitrices de la formation du biofilm par interférence avec l'un ou les 2 systèmes.

La première partie de cette thèse traite dans un premier temps de la mise en évidence d'un système AHL contrôlant la luminescence de *S. woodyi*. Les gènes codant pour les protéines et les enzymes impliqués dans ce système ainsi que ceux codant pour la luciférase et les enzymes responsables de la synthèse de ses substrats ont été identifiés. Nous avons montré que *S. woodyi* MS32 émet de luminescence à la fois dans son milieu de croissance en conditions planctoniques mais aussi en conditions sessiles. Une mutation des gènes *luxI* et *luxR* rend cette bactérie non luminescente et inhibe l'expression des gènes du QS. Nous avons également montré que *S. woodyi* synthétise la molécule signal C<sub>8</sub>-HSL qui est capable d'induire la luminescence contrairement à de nombreuses autres AHLs testées. La C<sub>8</sub>-HSL est synthétisée via la protéine LuxI (codée par le gène *luxI*, Swoo\_2998) puisque le mutant *luxI* déficient dans l'émission de luminescence, est complété par l'ajout de la C<sub>8</sub>-HSL. La C<sub>8</sub>-HSL est donc détectée par la protéine LuxR (codée par le gène *luxR*, Swoo\_2997). Sa liaison avec cet auto-inducteur, active l'expression de l'opéron *lux* (*luxCDABEG*) codant pour la luciférase et les enzymes responsables de la synthèse de ses substrats, ce qui se traduit par l'émission de la bioluminescence. Le complexe LuxR/C<sub>8</sub>-HSL active l'expression du gène *luxI* (boucle de rétrocontrôle positive), ce qui amène à une surproduction de LuxI et donc de la synthèse de C<sub>8</sub>-HSL, ce qui se traduit par une augmentation de la bioluminescence. Nous avons également examiné la capacité de ce système AHL à réguler un certain nombre de phénotypes associés à la formation du biofilm. Il a alors été démontré que l'invalidation du

gène *luxI* ou *luxR*, qui rend *S. woodyi* non luminescente, n'affecte ni l'adhésion, ni la formation et la structuration de biofilm. Elle n'induit pas non plus de modification dans l'interaction de *S. woodyi* avec une souche ambiante telle qu'*A. castellani* contrairement à ce qui a été montré avec *P. aeruginosa* mutée au niveau de *lasR* (codant pour le récepteur de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) par exemple (Pukatzki *et al.*, 2002). Puisqu'il a été montré que les réseaux de régulation du QS peuvent être imbriqués les uns avec les autres ainsi qu'avec d'autres réseaux de régulation tels que celui du c-di-GMP et des petits ARN, il n'est pas étonnant au final que le lien entre QS et formation du biofilm puisse être difficile à établir. De plus, la formation du biofilm correspond à une multitude de sous-phénotypes impliquant des mécanismes très différents, qui peuvent être chacun régulé directement ou indirectement par ces réseaux de régulation. Par conséquent, il est peu probable que le QS joue un rôle direct et unique dans la régulation de la plupart des phénotypes étudiés et une bonne connaissance des réseaux de régulation et des mécanismes impliqués dans la formation du biofilm est nécessaire pour mieux appréhender le lien entre QS et biofilm, s'il existe. Une analyse transcriptomique (RNAseq) de *S. woodyi* lorsque la bactérie se trouve dans différentes conditions de croissance (sessiles, planctoniques...) pourraient permettre de mettre en lumière quels types de gènes voient leur expression modifiée lors des différentes étapes de la formation du biofilm. Cette analyse pourrait alors être suivie par l'invalidation des gènes candidats identifiés susceptibles d'être impliqués dans ces différentes étapes. Notons que dans cette étude le fait qu'aucune autre AHLs ne modifie l'expression de la luminescence et ne complète le mutant *luxI*, suggère que *S. woodyi* pourrait faire un bon candidat pour un biosenseur marin pour la détection exclusive de la C<sub>8</sub>-HSL. Il existe des biosenseurs non marins de la C<sub>8</sub>-HSL mais ceux-ci reconnaissent en même temps d'autres AHLs (Zhu *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2005; Dickschat, 2010). Le fait que *S. woodyi* soit une bactérie marine à l'avantage que des tests simples sans étapes d'extraction puissent être effectués en conditions marines.

La deuxième partie de cette thèse a été dédiée à la caractérisation du système QS AI2 chez *S. woodyi*. Deux approches ont été menées en parallèle.

Tout d'abord, en utilisant *V. harveyi* et ses mutants comme biosenseurs et/ou sources d'AI2, la synthèse et la réception d'AI2 par *S. woodyi* ont été étudiées en évaluant l'émission de la luminescence. Ceci est basé sur le fait que AI2 est une molécule signal identifiée chez les Gram- et les Gram+ non spécifique à cause de la structure universelle de cette molécule

chez toutes les bactéries qui la produisent (Xavier and Bassler, 2003). Nous avons montré que *S. woodyi* MS32 est capable de synthétiser la molécule signal AI2. Ceci est confirmé par le fait que les gènes des deux enzymes Pfs et LuxS servant à sa synthèse sont présents dans le génome de *S. woodyi* MS32. Cependant, il semble qu'elle ne possède pas un récepteur pour cet auto-inducteur puisque l'addition d'AI2 exogène n'a pas modifié l'émission de la luminescence chez cette bactérie. D'autre part, concernant les gènes des récepteurs de l'AI2, deux types existent : le système à deux composants LuxP/Q et le système Lsr impliquant un transporteur de type ABC. Aucune protéine homologue à la protéine LuxP ou LuxQ responsables de la liaison et du déclenchement de la réponse QS chez les *Vibrionaceae* ne sont trouvées dans le génome de *S. woodyi* MS32. Concernant le système Lsr, deux gènes homologues ont été trouvés mais les protéines associées ne sont pas en mesure de déclencher une réponse spécifique AI2 à elles seules. Ces résultats suggèrent donc que *S. woodyi* MS32 synthétise l'AI2 mais ne posséderait pas de récepteur pour cette molécule. Il est donc possible que les enzymes Pfs et LuxS impliquées dans la synthèse de l'AI2 servent en réalité au recyclage du SAM dans le cycle de méthyle (Schauder *et al.*, 2001). Au final, l'absence de gènes connus codant pour un récepteur d'AI2 mais aussi l'absence d'effet de l'AI2 sur la luminescence suggèrent que *S. woodyi* n'aurait pas de récepteur d'AI2. Comme indiqué au chapitre 4, l'existence d'autres types de récepteurs d'AI2 est possible (Auger *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Rader *et al.*, 2011). L'inactivation de *luxS* nous permettrait de tester définitivement si en présence de l'AI2, un autre type de récepteur inconnu jusqu'à présent, serait en mesure de prendre le relais et de déclencher une réponse QS. En cas de résultat positif, une analyse transcriptomique avec ou sans AI2 pourrait permettre d'identifier un ou des récepteurs candidats potentiels. Dans le cas contraire, le rôle de LuxS chez cette bactérie serait uniquement métabolique.

La deuxième stratégie utilisée en parallèle de la caractérisation du système QS de type AI2 a consisté à tester une série de molécules décrites pour inhiber le système AI2 chez d'autres bactéries sur l'émission de la luminescence mais aussi sur l'adhésion et la formation du biofilm de *S. woodyi*. Parce que le système AI2 est considéré comme un système universel utilisé à la fois chez les Gram- et les Gram+, que l'inactivation de *luxS* inhibe la formation du biofilm chez *S. oneidensis*, et que LuxS serait peut-être impliqué dans la synthèse d'AHLs de par son action sur la régénération du SAM, ce système QS apparaissait comme une cible intéressante pour tester des molécules QSI. La première catégorie de molécules sélectionnées appartient aux molécules de pyrogallol, des composés polyphénoliques présents chez les

végétaux (Defoirdt *et al.*, 2013). Ces molécules peuvent inhiber la luminescence de *V. harveyi* MM32 (*luxN*::Cm, *luxS*::Tn5 Kan) possédant un système AHL inactif, avec une concentration inférieure à la CMI (Ni, Choudhary, *et al.*, 2008). De plus, le 1,2,3-trihydroxy-benzène peut inhiber la luminescence et la virulence de la souche sauvage *V. harveyi* BB120 (Defoirdt *et al.*, 2013). Il semblerait qu'aucune inhibition du système QS de type AHL n'ait été observée en présence de ces molécules sur des souches de *C. violaceum* et de *P. aeruginosa* (Hossain *et al.*, 2017). La deuxième catégorie de molécules testées sont les molécules d'acide boronique qui ont été synthétisées en se basant sur la structure moléculaire d'AI2 contenant une molécule de borate. Ces composés mimeraient l'AI2 et inhiberaient sa liaison au récepteur LuxP, conduisant ainsi à une inhibition du système AI2. L'efficacité de ces molécules à inhiber le système AI2 a été rapportée par les mêmes auteurs en utilisant la souche *V. harveyi* MM32 (*luxN*::Cm, *luxS*::Tn5 Kan) (Ni, Chou, *et al.*, 2008). Ces molécules d'acide boronique sont classées comme des inhibiteurs compétitifs d'AI2. Leur effet sur le système AHL de QS n'a pas été testé à ce jour.

Tout d'abord nous avons vérifié que ces molécules n'avaient aucun effet sur la croissance bactérienne, l'objectif étant d'utiliser des molécules à des concentrations ne présentant pas de toxicité. Nous avons montré que des molécules de pyrogallol et d'acide boronique avaient un effet à la fois sur la luminescence, l'adhésion et/ou la formation du biofilm chez *S. woodyi*. Les molécules de pyrogallol montrent cependant un effet inhibiteur plus important sur le biofilm que les molécules d'acide boronique. Une des molécules de la famille du pyrogallol présente un effet inhibiteur à la fois sur le QS (la luminescence), l'adhésion et la formation du biofilm chez *S. woodyi*. Le mode d'action de ces molécules chez les différentes espèces testées reste à être confirmé. Dans notre étude, ces molécules ont donc l'avantage d'inhiber de manière non toxique la formation du biofilm. Il reste à démontrer par quel mécanisme cette inhibition s'effectue chez *S. woodyi*.

Au final, compte-tenu du fait que le système QS de type AI2 ne semble pas actif, et que le système QS de type AHLs ne semble pas réguler la formation du biofilm chez *S. woodyi*, il est vraisemblable que ces molécules agissent via d'autres mécanismes cellulaires pour inhiber la luminescence, l'adhésion et la formation du biofilm. Afin de vérifier que le système QS de type AI2 n'est définitivement pas impliqué, les effets de ces molécules pourraient être vérifiés sur un mutant *luxS*. Afin de vérifier quel(s) mécanisme(s) pourraient être potentiellement impliqués, et puisque le greffage de ces molécules semble possible (Elegir *et al.*, 2008; Spizzirri *et al.*, 2009), il pourrait être intéressant d'envisager des

expériences de type chromatographie d'affinité afin d'identifier leur(s) cible(s) potentielles. Ces expériences pourraient donner des informations sur le type de mécanisme impliqué via l'identification des molécules de *S. woodyi* à laquelle les pyrogallols pourraient se lier. Il est possible qu'une approche transcriptomique sur *S. woodyi* en conditions sessiles traitées ou non avec la molécule de pyrogallol efficace sur les trois phénotypes, puisse également donner des informations sur les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la luminescence, de l'adhésion et du biofilm.

Dans l'ensemble, cette étude aura permis de caractériser deux des systèmes QS les plus largement répandus chez *S. woodyi*. Cette bactérie a donc un système actif, basé sur les AHLs mais, qui ne semble pas réguler la formation du biofilm. La régulation de ce système se fait par l'intermédiaire unique de la C<sub>8</sub>-HSL, ce qui pourrait en faire un biosenseur marin pour cette AHL. Par ailleurs, elle posséderait un système QS de type AI<sub>2</sub> inactif. Des expériences visant à confirmer ces résultats et à mieux comprendre les mécanismes impliqués devront être effectués. Il restera également à vérifier que les autres systèmes QS déjà identifiés, s'ils sont présents, ne soient pas impliqués afin de définitivement affirmer que chez *S. woodyi*, le biofilm se forme indépendamment de la communication interbactérienne QS. Comme expliqué plus haut, l'inhibition du biofilm et du biofouling de manière non toxique et respectueuse de l'environnement ne pourra se faire en environnement ouvert tel que l'environnement marin qu'avec l'utilisation de cocktails de molécules pouvant cibler différents mécanismes afin d'agir sur le plus grand nombre de bactéries possibles. Si l'utilisation des molécules de pyrogallol qui semble agir indépendamment du QS, nous permet d'obtenir un résultat satisfaisant pour l'inhibition du biofilm, il sera nécessaire, afin d'être certain de leur innocuité sur les cellules (eucaryotes et procaryotes), de bien comprendre leur mode d'action.

## 2. Références bibliographiques

- 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. *Appl Environ Microbiol* **67**: 575–585.
- Antunes, L.C.M., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B.R., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G., and Greenberg, E.P. (2007) Transcriptome Analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI Regulon. *J Bacteriol* **189**: 8387–8391.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., and Gohar, M. (2006) Autoinducer 2 Affects Biofilm Formation by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 937–941.
- Defoirdt, T., Pande, G.S.J., Baruah, K., and Bossier, P. (2013) The Apparent Quorum-Sensing Inhibitory Activity of Pyrogallol Is a Side Effect of Peroxide Production. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2870–2873.
- Dickschat, J.S. (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* **27**: 343.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol Microbiol* **31**: 1197–1204.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., and Orlandi, M. (2008) Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol* **43**: 84–92.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**: 6902–6914.
- Hossain, M.A., Lee, S.-J., Park, N.-H., Mechesso, A.F., Birhanu, B.T., Kang, J., *et al.* (2017) Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Sci Rep* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587592/>. Accessed January 9, 2018.
- Khan, S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S., and Farrand, S.K. (2005) Activation of the phz operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting phz box. *J Bacteriol* **187**: 6517–6527.
- Kolter, R., and Greenberg, E.P. (2006) Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**: 300–302.
- LaSarre, B., and Federle, M.J. (2013) Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 73–111.
- Learman, D.R., Yi, H., Brown, S.D., Martin, S.L., Geesey, G.G., Stevens, A.M., and Hochella, M.F. (2009) Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in Biofilm Development and Sulfur Metabolism. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1301–1307.
- Li, L., Xu, Z., Zhou, Y., Li, T., Sun, L., Chen, H., and Zhou, R. (2011) Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microb Pathog* **50**: 293–302.



- Liu, Z., Zhao, J., Liang, X., Li, K., Xiao, X., Zhu, J., *et al.* (2012) Characterization of luminescent *Vibrio campbellii* LZ5 and its potential application in the detection of environmental heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* **59**: 405–410.
- Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., Lu, C.-D., Tai, P.C., and Wang, B. (2008) Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 590–594.
- Ni, N., Choudhary, G., Li, M., and Wang, B. (2008) Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 1567–1572.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3159–3164.
- Rader, B.A., Wreden, C., Hicks, K.G., Sweeney, E.G., Ottemann, K.M., and Guillemin, K. (2011) *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiol Read Engl* **157**: 2445–2455.
- Reichelt, J.L., and Baumann, P. (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Für Mikrobiol* **94**: 283–330.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**: 463–476.
- Spizzirri, U.G., Iemma, F., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O.I., and Picci, N. (2009) Synthesis of Antioxidant Polymers by Grafting of Gallic Acid and Catechin on Gelatin. *Biomacromolecules* **10**: 1923–1930.
- Watnick, P., and Kolter, R. (2000) Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675–2679.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6578–6583.
- Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z., and Markowska, K. (2016) Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet* **57**: 225–238.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**: 191–197.
- Zhao, A., Zhu, J., Ye, X., Ge, Y., and Li, J. (2016) Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Food Microbiol* **230**: 73–80.
- Zhu, J., Beaver, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the Autoinducer 3-Oxo-octanoyl-Homoserine Lactone Strongly Inhibit Activity of the TraR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 5398–5405.
- Zhu, J., Zhao, A., Feng, L., and Gao, H. (2016) Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *Int J Food Microbiol* **217**: 146–155.



**HAYEK Mahmoud**

Laboratoire MAPIEM, université de Toulon

**Le Quorum sensing chez la bactérie marine *Shewanella woodyi* : Rôle dans l'émission de luminescence et dans la formation du biofilm**

Le « quorum sensing » (QS) est un moyen de communication bactérienne impliquant des petites molécules appelées auto-inducteurs qui au-delà d'un certain seuil de concentration induisent une synchronisation de l'expression génétique au sein de la communauté bactérienne. Ce mécanisme est impliqué dans plusieurs processus bactériens tels que la luminescence, la formation du biofilm, ce qui en fait une cible privilégiée pour l'inhibition du biofilm bactérien nuisible aux activités humaines. Plusieurs systèmes QS ont été identifiés ; les plus étudiés sont le système AHL (acyl homoserine lactone) et le système AI2 (auto inducteur 2). L'objectif principal de cette thèse est de caractériser le(s) système(s) QS de *Shewanella woodyi*, une bactérie marine luminescente capable de coloniser rapidement une surface et de former un biofilm. L'utilisation de biosenseurs de référence et des expériences de LC-MS ont montré que *S. woodyi* synthétise la C<sub>8</sub>-HSL et l'AI2. La mutation des gènes impliqués dans la synthèse ou la détection des HSL abolit la luminescence mais n'affecte pas la formation du biofilm. De plus, le système AI2 ne semble pas impliqué dans la luminescence et la formation de biofilm de *S. woodyi*. L'absence d'un récepteur d'AI2 suggère que cette molécule n'a pas un rôle régulateur et qu'elle ne serait qu'un produit secondaire du métabolisme cellulaire. Ce travail a donc permis de caractériser les 2 principaux systèmes QS de *S. woodyi* et pourrait permettre d'en faire un nouveau biosenseur marin.

**Mot clés :** Quorum sensing, *Shewanella woodyi*, AHL, AI2, luminescence, biofilm, bactérie biosenseur

**Quorum sensing in the marine bacterium *Shewanella woodyi*: Role in luminescence emission and biofilm formation**

Quorum sensing (QS) is a bacterial communication system involving small molecules called autoinducers which above a threshold concentration, induce the synchronization of genes expression within the bacterial community. This mechanism is involved in several bacterial processes such as luminescence and biofilm formation, making it a preferred target for the inhibition of bacterial biofilm harmful to human activities. Several QS systems have been identified; the most studied ones are the AHL system (acylhomoserine lactone) and the AI2 system (autoinducer 2). The main objective of this thesis is to characterize the QS system (s) of *Shewanella woodyi*, a luminescent marine bacterium able to rapidly colonize a surface and form a biofilm. The use of reference biosensors and LC-MS experiments have shown that *S. woodyi* synthesizes C<sub>8</sub>-HSL and AI2. The mutation of the genes involved in the synthesis or detection of HSL abolishes luminescence but does not affect the biofilm formation. Moreover, the AI2 system does not appear to be involved in the luminescence and biofilm formation of *S. woodyi*. The absence of an AI2 receptor suggests that this molecule does not have a regulatory role and that it is only a secondary product of cellular metabolism. This work has allowed the characterization of the 2 main QS systems of *S. woodyi*, which could make this strain a new marine biosensor.

**Keywords:** Quorum sensing, *Shewanella woodyi*, AHL, AI2, luminescence, biofilm, bacterium biosensor