

## **THESIS / THÈSE**

#### **DOCTEUR EN SCIENCES**

Quorum sensing chez Brucella melitensis : carctérisation du régulateur transcriptionnel VjbR et de son régulon

Bonnot, Sophie

Award date: 2007

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- · Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
  You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* : caractérisation du régulateur transcriptionnel VjbR et de son régulon

Dissertation présentée par Sophie Uzureau en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

#### **Composition du jury :**

Pr. J-J. Letesson (Promoteur, FUNDP, Namur)Pr. X. De Bolle (Co-promoteur, FUNDP, Namur)Pr. M. Raes (FUNDP, Namur)Pr. P. Cornelis (VUB, Belgique)Pr. A. Pugsley (Institut Pasteur Paris, France)

## Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* : caractérisation du régulateur transcriptionnel VjbR et de son régulon

Par Sophie Uzureau

#### RESUME

Le Quorum Sensing est un système de communication bactérien permettant à une population de coordonner l'expression de gènes cibles en fonction de sa densité ou des propriétés du milieu (diffusion, flux....). Chez les bactéries à Gram négatif, le Quorum Sensing est basé sur la synthèse et la détection de petites molécules signal appelées N-acyl-homosérine lactones (AHLs). Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR sont les médiateurs de ce système de régulation. Lorsque la concentration en AHLs augmente, ces molécules se fixent au domaine N-terminal d'un régulateur LuxR et provoquent des changement conformationnels entraînant une modification de l'activité du régulateur. Un tel système de régulation a été mis en évidence chez la bactérie Gram négative Brucella melitensis. Cette bactérie pathogène intracellulaire synthétise une dodécanoyl-homosérine lactone (C<sub>12</sub>-HSL) et possède deux régulateurs de type LuxR : VjbR et BabR. VjbR est impliqué dans la virulence de *B. melitensis* et est indispensable à l'expression de deux facteurs de virulence: le système flagellaire et le système de sécrétion de type IV VirB. Les C<sub>12</sub>-HSL ont quant à elles un effet répresseur sur ces deux structures membranaires. Durant ce travail, la mutation du domaine Nterminal du régulateur VjbR a permis de démontrer la capacité de VjbR à médier l'effet des C12-HSL sur l'opéron virB. Les souches mutées dans le gène vjbR forment des agrégats en cultures liquides. Nous avons montré que ce phénotype est lié à la production d'un exopolysaccharide, suggérant pour la première fois que Brucella pourrait former des structures de type biofilm. Cette étude a également permis de mettre en évidence un rôle majeur de VjbR dans la régulation de structures de surface puisque ce régulateur est impliqué dans le contrôle de l'expression de nombreuses protéines de membrane externe (Omp). L'utilisation de la technique d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP) a permis de montrer que VjbR régule directement deux de ces Omps ainsi que l'opéron virB. La virulence de Brucella est en partie basée sur sa capacité à dévier le trafic intracellulaire de ses cellules hôtes (phagocytes professionnels et nonprofessionnels) et à s'y multiplier. Lors de son cycle infectieux, Brucella est confrontée à de nombreux stress et environnements différents, suggérant la nécessité d'une régulation génétique fine en réponse à des stimuli environnementaux. Le Quorum Sensing, de par son implication dans la virulence de ce pathogène pourrait être impliqué dans de telles régulations. Afin d'aborder de façon globale le rôle de VjbR et de BabR chez B. melitensis, des études transcriptomique et protéomique des mutants  $\Delta v i b R$  et  $\Delta b a b R$  ont été réalisées. Ces études ont permis de mettre en évidence que le Quorum Sensing chez B. melitensis est un système de régulation global, puisqu'il permet de réguler 10% du génome dans les conditions testées (dont 9% sous le contrôle de VjbR). De nombreuses cibles de ces régulateurs sont impliquées dans la virulence et l'adaptation aux conditions de stress (oxydatif, métabolique...), suggérant un rôle important du Quorum Sensing dans l'accomplissement du cycle infectieux de B. melitensis.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix Faculté des Sciences Département de Biologie Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgique

## Quorum Sensing in *Brucella melitensis*: characterization of the transcriptional regulator VjbR and its regulon

By Sophie Uzureau

#### SUMMARY

Quorum Sensing is a bacterial communication system wich allows the coordinated gene expression within a population regarding its density and environmental properties (diffusion, flow...). In Gram negative bacteria, Quorum Sensing is based on the synthesis and the detection of small diffusible molecules called N-acyl-homoserine lactones (AHLs). LuxR transcriptional regulators are the mediators of these regulation systems. When AHL concentration increases, these molecules bind to the N-terminal domain of a LuxR-type regulator and leads to conformational changes driving the modification of the regulator activity. A similar regulation system has been discovered in the Gram negative bacteria Brucella melitensis. This intracellular pathogen synthesizes a dodecanoylhomoserine lactone (C<sub>12</sub>-HSL) and possesses two LuxR-type regulators: VjbR and BabR. VjbR is involved in the virulence of this pathogen and is crucial for the expression of two virulence factors : the flagellar system and the type four secretion system VirB. C<sub>12</sub>-HSL have a repressor effect on these two membrane structures. During this work, mutation of the N-terminal domain of VjbR allowed us to demonstrate the ability of VjbR to mediate  $C_{12}$ -HSL effect on the virB operon. vjbR mutated strains aggregate in liquid cultures. We have demonstrated that this phenotype is linked to the production of an exopolysaccharide, suggesting for the first time that Brucella could form biofilm-type structures. This study also demonstrates that VjbR has a major role in the regulation of surface structures because this regulator controls the expression of many outer membrane proteins (Omp). Using the chromatin immunoprecipitation technique (ChIP), we have shown that two of these Omps, as well as the virB operon, are directly regulated by VjbR. The virulence of Brucella is partly based on its ability to deviate the intracellular traffic of its host cells (professional and nonprofessional phagocytes) and to proliferate within these cells. During its infectious cycle, Brucella faces numerous stresses and environments, suggesting the necessity of a finely tuned genetic regulation depending on environmental stimuli. Quorum Sensing, through its involvement in the virulence of this intracellular pathogen, could be involved in such regulations. In order to investigate the role of VjbR and BabR in B. melitensis, global transcriptomic and proteomic studies of  $\Delta v i b R$  and  $\Delta b a b R$  mutants were performed. These studies demonstrate that Quorum Sensing is a global regulation system in *B. melitensis* because it controls the expression of 10% of the genome in the condition tested (9% through VjbR). Numerous targets of these two regulators are involved in virulence and adaptation to environmental stresses (oxydative, metabolic...), suggesting an important role of Quorum sensing in the achievement of the infectious cycle of B. melitensis.

Cette thèse, il y a quelques années, je n'aurais même pas osé y penser... Et la voici maintenant achevée... Si ce défi a pu être relevé, c'est surtout grâce à tous ceux qui m'ont entourée... Voici donc venu le moment de remercier les nombreuses personnes sans qui cette thèse n'existerait pas...

Tout d'abord, Jean-Jacques et Xavier ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir accueillie les bras grands ouverts... Je me souviens encore de ce jour où, venue de Paris je vous ai rencontrés. Autour d'un café, dans le bureau du Chef, vous m'avez parlé avec passion de cette bactérie fantastique qui ne fait rien comme les autres... Durant mes études, le fait que les bactéries puissent communiquer entre elles m'avait déjà fascinée... Un tout grand merci donc, de m'avoir permis de travailler ces quelques années sur ce sujet passionant... Après ces quatre années de thèse, ma curiosité n'est toujours pas assouvie et me voici avec mille et une nouvelles interrogations !!! C'est sans doute ça, le côté fascinant de la recherche... Merci à vous deux de m'avoir accueillie au laboratoire et d'avoir toujours été là pour partager joies et déceptions qui font le quotidien de la thèse...

Chef, merci pour la confiance et la liberté, si précieuses, que vous m'avez accordées... Parfois difficiles à gérer, toujours motivantes, elles ont été, tout le long de cette thèse, un moteur formidable... Merci pour ces discussions sur «le pourquoi du comment" qui n'ont cessé de me titiller d'avantage et de me pousser à me poser de nouvelles questions ! Grâce à vous, je finis cette thèse avec encore plus de passion pour la recherche...

Xa, merci pour ta disponibilité (sans limite) qui explique certainement pourquoi tu as definitivement eliminé le mode "marche" dans les couloirs du labo au profit du mode "course" pour pouvoir être partout en même temps (mais comment fais-tu ?!!). Merci pour nos nombreuses discussions et divagations autour de VjbR...

Je remercie Madame Martine Raes et Messieurs Anthony Pugsley et Pierre Cornelis d'avoir accepté de donner leur avis critique sur ce travail.

Durant ces quatre années, j'ai eu la chance de travailler avec trois autres passionés du Quorum Sensing, trois personnes qui m'ont beaucoup apporté. Je vous remercie d'avoir supporté tous mes travers durant ces quelques annnées...

Les anciens d'abord ! Chantal, un sacré phénomène ! Je voudrais te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Après ton départ, le labo a semblé bien vide sans tes délires entre les paillasses (je te vois encore jouer les petits rats de l'opéra !). Merci pour nos nombreuses discussions, scientifiques ou non. Merci pour ton soutien sans faille et ton amitié si précieuse. Je te souhaite une très belle route à venir...

Julien, j'ai eu la chance de travailler avec toi non seulement dans l'étude du QS mais aussi pour la responsabilité du BL3 !. Merci pour nos nombreuses crises de fou rire (notamment devant le poster des "Biochemichal Pathways", des moments inoubliables !!! On a bien failli s'arracher les cheveux !). Il faut aussi savoir que Julien, c'est LE gourmand du labo. C'est un véritable supplice quand on veut essayer de faire attention à sa ligne ! Ses tiroirs sont toujours plein d'horribles kit et kat, léo, melo-cakes, et pire de cuberdons (merci de me les avoir fait découvrir ;-)!!!

Il y a aussi Super Marie G, une mémorante inoubliable... Je te revois encore dans les premiers jours du mémoire me dire que tu ne voulais pas faire de thèse. Tu ne peux pas savoir comme je suis heureuse que tu aies changé d'avis ! Merci pour ta joie de vivre, pour la passion que tu mets dans tout ce que tu fais et pour nos nombreuses discussions. J'espère que notre amitié sera longue. Ernest est très impatient de te rencontrer, reconnaitra-t-il ta voix ?!!!

Je voudrais aussi remercier tous ceux qui ont partagé le même bureau que moi ... Sans vous ces années auraient été bien fades ! Tout d'abord Jo et Dédé ! Merci pour votre bonne humeur inébranlable ! Merci aux deux autres Maries (la grande et la petite !!!) avec lesquelles j'ai eu la chance de partager le bureau... Merci à toutes les deux pour tous nos blablas qui ont été de sacrés soutiens lorsque tout n'allait pas comme sur des roulettes ! Régis, merci pour nos nombreuses discussions et pour tes conseils toujours avisés. Tu as été d'une aide précieuse durant cette thèse...

Il a de nombreuses autres personnes qui ont beaucoup comptés durant ces quelques années...

Ríchard, un personnage hors du commun... Ta franchise et ta sincérité sont un véritable trésor. Surtout conserve les toujours... Merci pour l'amitié que nous partageons et qui je l'espère sera encore longue...

Laurence, merci pour tous nos petits soupers qui ont été autant de bouffées d'oxygène, notamment dans la dernière ligne droite ! Bientôt docteur et pleine de talents, l'avenir ne peut que te sourire...

Nico, (aussi apellé "coin-coin" ! ) merci d'avoir été un si chouette voisin de paillasse durant trois ans... Merci aussi pour tous nos papotages Ciné et autres !

Caro, nous en aurons partagé des choses ces derniers mois ! Rédaction et gros bidous, que d'émotions... J'admire beaucoup ton courage et ta détermination. Merci pour ton soutien sans faille et pour nos nombreuses discussions... C'est la dernière ligne doite, tu es bientôt docteur ! Je te souhaite beaucoup de bonheur à venir.

Allan, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir initiée aux joies des IP chromatiniennes... Merci pour tes conseils durant les mises au point. Sans toi, j'y serais toujours !

Valérie (et pas "valoche" !), merci pour ta bonne humeur, a tes côtés, on est obligé de voir la vie en rose !

Il y a aussi tous les autres "URBMiens" qui ont tous participé d'une façon ou d'une autre à cette période formidable : Alex, Didier , Sophie trois autres exilés français ! Gégé, Maxou

(merci pour les nouvelles sur les séries cultes !), Bernard (merci pour ton aide dans la rédaction en Anglais), Matthieu et son sourire inaltérable, Rosse-Mary et son accent chantant, Jon (courage pour la dernière lígne droite), France et sa bonne humeur permanente... Et puis les petits nouveaux : Marie-Alice, Aurélie, Fanélie, Aurore, Marie, Charles : bonne chance pour la suite !

Isa Hou, Monsieur Vandenhaute, Damien, Jean-Yves, merci pour vos conseils suite aux réunions de labo, les avis extérieurs sont toujours très enrichissants.

Merci à l'équipe bioinfo pour votre aide dans les labyrinthes des statistiques ! Etienne merci pour ton aide lorsque je me suis retrouvée face à des "fichiers corrompus" (je ne comprends pas pourquoi ça arrive toujours au pire moment !).

Mercí aux Moníque, Rose-Ma et Christian pour votre disponibilité durant cette thèse, votre aide a été très précieuse à de nombreuses reprises...

Vincianne et Thierry, un tout grand merci pour m'avoir supportée durant la période de rédaction, merci aussi pour vos encouragements ! Ca a été un vrai plaisir de partager votre bureau pendant ces quelques mois... Garçon, à quand un CD spécial thésard en rédaction ? Vincianne, tu as un coeur en or, j'espère que l'avenir t'apportera tout le bonheur que tu mérites...

De façon générale je voudrais remercier tout le labo d'avoir si bien accueilli une française parmi vous (presque parisienne en plus !), et de m'avoir initiée aux traditions belges ! Grâce à vous tous, la Belgique restera à jamais gravé dans mon coeur...

Je dois également énormément à Edouard Delaive et à Marc Dieu. Deux personnes formidables et d'une patience sans faille. J'ai beaucoup appris à vos côtés et sans vous beaucoup de choses n'auraient pas été possibles...

Petit clin d'oeil, je ne peux m'empêcher de remercier la firme Steritec pour ses nombreuses visites qui ont ponctué ces dernières années !

Mercí aussí à *Brucella*, parfois capricieuse, souvent surprenante mais toujours aussi intriguante !

Maman, durant toutes ces années, tu n'as cessé de m'encourager à aller jusqu'au bout de mes rêves, de mes envies...Sans ta présence, ta confiance, je n'y serais pas arrivée. Merci d'avoir toujours été là pour moi... Mouty et Paty, votre soutien et vos encouragements m'ont aussi été très précieux. L'amour et la confiance que vous me portez tout les trois sont chaque jour une aide précieuse..

Merci aussi à toute ma belle famille ! En épousant Pierrick, j'ai gagné les frères et soeurs dont j'avais rêvé... Merci de m'avoir accueillie parmi vous aussi chaleureusement.

Pierrick, mon coeur, comment trouver les mots pour te dire ce que ta présence à mes côtés m'a apporté durant ces huit dernières années... Aucun n'est assez fort... Sans ton soutien et ta confiance sans faille, je n'aurais pas pu y arriver...Merci pour tout ce que tu fais pour moi, merci d'avoir été là quand je n'y croyais plus... Tu as fait de ces dernières années une suite de joies toutes plus belles les unes que les autres. Quel bonheur de porter dans mon ventre notre petit bout de chou, le plus beau cadeau que tu aies pu me faire...

### TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	5
Table des abréviations	7
I INTRODUCTION	
I.1 LE MONDE BACTÉRIEN	17
[]] La diversité du monde bactérien	17
<i>I.1.2 Des animalcules au séquencage de génomes bactériens</i>	
1 3 0 0	
I.2 COMPORTEMENTS SOCIAUX CHEZ LES BACTÉRIES	
I.2.1 Biofilm : un mode de vie longtemps sous-estimé	
I.2.2 Mort cellulaire programmée chez les bactéries : survie et protection	
<i>1.2.3 La coopération pour subvenir aux besoins nutritionnels</i>	
<i>I.2.4 L'union fait la force, ou comment les bactéries communiquent</i>	
I.3 LA COMMUNICATION BACTÉRIENNE	
1.3.1 La découverte de la communication bactérienne	
<i>I.3.2</i> Les types différents types de communication utilisés par les bactéries	
I.3.2.1 AI-1 : Communication intra-espèce	
I.3.2.1.1 Exemple de QS chez les bactéries Gram positive : <i>Staphylococcus aureus</i>	
I.3.2.1.2 Exemple de QS chez une bactérie Gram négative : <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
1.3.2.2 AI-2 : Communication inter-espèce	
1.3.2.5 AI-5 : Communication inter-regne	
I.S.S Evolution au concept de communication dactemente et point de vie evolutij	
I.3.3.2 Diffusion Sensing	
I.3.3.3 Efficiency Sensing	
I.4 QUORUM SENSING CHEZ LES BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES : PRINCIPES MOLÉCULAIRES	
1.4.1 Diversité des signaux de type AHLs	
I.4.2 Les AHL-synthases	
1.4.3 Les régulateurs de type LuxR	
I.4.3.1 Domaine de liaison aux AHLs	
I.4.3.2 Domaine de liaison à l'ADN	
I.4.3.3 Régulons dépendants du Quorum Sensing	
I.5 LE QUORUM SENSING, UN SYSTÈME PARFOIS COMPLEXE	
I.5.1 Intégration du OS dans d'autres réseaux de régulation : le cas de P.aeruginosa	
I.5.2 sRNA et Quorum Sensing	
I.5.2.1 Principe de fonctionnement des sRNA	50
I.5.2.2 Implication des sRNA dans la régulation des systèmes de QS	
1.5.3 Le Quorum Quenching, ou comment « brouiller » les voies de communications	
I.5.3.1 Mécanismes d'interférence	
1.5.3.2 Degradation des signaux de communication	
1.5.4 Reponse des centites encaryones à la présence de signait Q5 duciertens	
I.6 BRUCELLA ET LA BRUCELLOSE	
I.6.1 Le genre Brucella	
I.6.2 La brucellose	
I.6.2.1 Découverte de la brucellose	59
1.6.2.2 Prévalence actuelle de la brucellose	
1.0.5 Adaptation de Brucella d'hote	
I 6 3 2 Déterminants moléculaires de la virulence de <i>Brucella</i>	
I.6.3.3 Réponse aux stress rencontrés lors de l'infection	
I.6.3.3.1 Réponse générale	
I.6.3.3.2 Réponse au stress oxydatif	

	I.6.3.3.3 I.6.3.3.4	Réponse au stress acide Adaptation métabolique	65 66
17	I E Olioriim	Sensing chez <i>Brucei i a mei itensis</i>	66
1.7	LE QUORUM	SENSING CHEZ DRUCELLA MELITENSIS	00
I.7	7.1 AHLse	et AHL-synthase	66
1.7	2 Régula	teurs de type LuxR	67
1.7 1.7	7.5 Les cib 7.4 Un sys	tème de Quorum Quenching chez Brucella ?	07 68
II OI	.+ On sys	II TRAVAII	 60
111	RESULTAT	5	73
III.1 doma	RECHERCHE	D'UN LIEN DIRECT ENTRE VJBR ET LES $C_{12}$ -HSL : CARACTÉRISATION DE MUTANTS DANS LE DN AUX AHLS.	74
	11 "Mı	itations of the Quorum Sensing dependent regulator VibR lead to drastic surface modification	s in
Br	ucella meliter	nanons of the Quorum sensing-dependum regulator Vjok ledd to drushe surface modification. Isis »	,
III	.1.2 Info	rmations complémentaires	88
	III.1.2.1 H	Expression du domaine de liaison aux AHLs de VjbR dans la souche B. melitensis sauvage	88
	III.1.2.2 N	Iodèle de régulation du phénotype d'agrégation	89
III.2	RECHERCHE	DE CIBLES DIRECTES ET INDIRECTES DE VJBR : TRANSCRIPTOMIQUE, PROTÉOMIQUE ET CHIP	90
IV	DISCUSSIO	N ET PERSPECTIVES	137
IV.1	VJBR, RÉCEP	TEUR DES C <sub>12</sub> -HSL	137
IV.2	LE QS CHEZ	Brucella spp., un système complexe	139
IV.	.2.1 AH	s et AHL-synthase	139
IV.	.2.2 L'A	HL acylase	140
IV.	.2.3 Vjbl	$R$ , $BabR$ et les $C_{12}$ -HSL	140
IV.	.2.4 Bab	R, un modérateur de l'activité de VjbR ?	141
IV.3	VJBR, RÉGUI	ATEUR GLOBAL CHEZ <i>B. MELITENSIS</i>	143
IV.	.3.1 Rôle	e de VjbR dans la régulation de la composition membranaire	143
IV.	.3.2 Rôle	e de VjbR dans la virulence de B. melitensis	144
IV.4	DISCUSSION	SUR LE RÔLE DU QS DURANT L'INFECTION	145
V BI	BLIOGRAP	HIE	148

### TABLE DES ABRÉVIATIONS

2D-DIGE	«Two-dimentional Differential in-gel analysis »
$3-$ oxo- $C_{12}$ -HSL	<i>N</i> -3-oxo-dodécanoyl homosérine lactone
3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL	N-3-oxo-octanoyl homosérine lactone
a.a	acide amnié
ABC	« ATP-binding cassette »
Acyl-CoA	Acyl coenzyme A
ACP	« Acyl carrier protein »
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Attachement-effacement (lésions de type AE)
AHL	<i>N</i> -acyl- <sub>1</sub> -homosérine lactone
AI	Autoinducteur
Ala	Alanine
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Asp	Aspartate
BCV	« Brucella containing vacuole »
C <sub>s</sub> -HSL	<i>N</i> -Octanoyl homosérine lactone
C <sub>4</sub> -HSL	<i>N</i> -Butyryl homosérine lactone
C <sub>12</sub> -HSL	N-Dodécanovl homosérine lactone
ChIP	« Chromatin immunoprecipitation »
СоА	Coenzyme A
CTD	« C-terminal domain »
DKP	Diketopiperazine
DPD	4,5-dihydroxy 2,3 pentanedione
DS	« Diffusion sensing »
DSF	« cis-11-Methyl-2-dodecenoic acid »
EHEC	« Enterohemorrhagic Escherichia coli »
EPS	Exopolysaccharide
ES	« Efficiency sensing »
GBL	y butyrolactones
HSL	Homosérine lactone
НТН	Hélice-tour-hélice
IL.	Interleukine
K <sub>D</sub>	Constante de dissociation
kDa	Kilo Dalton
km	Kilomètre
LEE	« Locus of enterocyte effacement »
LPS	Lipopolysaccharide
nM	Nanomolaire
OMP	« Outer membrane protein »
ORF	« Open reading frame »
Pb	Paire de base
Phe	Phenylalanine
ppGpp	3' pyrophosphate guanosine diphosphate
POS	« <i>Pseudomonas</i> quinolone signal »
0.Š	« Quorum sensing »
Qrr	« Quorum regulatory RNA »
-	

« Ribosome binding site »
S-adenosyl methionine
S-adenosyl homocystéine
« small RNA »
« Type three secretion system »
« Type four secretion system »
« Tumor inducing », Ti plasmid
« Thin layer chromatography »
« Tumor necrosis factor $\alpha$ »
Tryptophane
Tyrosine

# Introduction

#### I Introduction

#### I.1 Le monde bactérien

Les micro-organismes partagent notre quotidien depuis toujours, ils sont la plus ancienne forme de vie connue sur terre, et sont à l'origine de toute vie sur notre planète. L'astronome Carl Sagan (1934-1996) proposa un calendrier cosmique dans lequel l'âge de l'univers est comparé à une année. D'après ce calendrier, si le Big Bang correspond à la première seconde du jour de l'an, et le jour d'aujourd'hui à la dernière seconde du 31 décembre, le système solaire se serait formé le 13 septembre, les premières bactéries seraient apparues le 30 septembre, et les premiers bipèdes le 31 décembre (voir Table 1). Depuis l'apparition de l'Homme sur terre, les bactéries ont donc partagé son quotidien, et ces êtres vivants si différents, ont dû cohabiter et s'adapter les uns aux autres.

1 <sup>er</sup> janvier, 0h 0min 0s	Big-Bang	-15 milliards d'années
Janvier	Premières galaxies	-13 milliards d'années
Mai	Formation de la voie lactée	-11 milliards d'années
13 septembre	Formation du système solaire	-4,5 milliards d'années
30 septembre	Premières bactéries	-3,8 milliards d'années
7 décembre	Formation de l'atmosphère terrestre	-1 milliard d'années
17 décembre	Premiers vertébrés, premiers poissons	-570 millions d'années
26 décembre	Début du règne des dinosaures	-220 millions d'années
31 décembre, 22h15 min	Apparition des premiers bipèdes (Lucy)	-3 millions d'années
31 décembre, 23h 40 min	Age de Pierre	-0,5 millions d'années
31 décembre, 23h59 min, 50s	Pyramides d'Égypte	-5000 ans
31 décembre, 23h59 min, 59,9s	Armstrong marche sur la Lune (1969)	-38 ans
31 décembre, 24 heures	Année 1996	

Table 1 : Extrait du calendrier cosmique de Carl Sagan.

#### I.1.1 La diversité du monde bactérien

L'importance des microorganismes dans l'équilibre des écosystèmes a longtemps été sousestimée. Ils sont notamment indispensables aux cycles biogéochimiques de la biosphère et représentent une grande portion de la diversité génétique du monde vivant. On a pu estimer que le nombre total de bactéries sur terre était de l'ordre de  $10^{30}$ , ce qui représente approximativement entre 60 et 100% de la biomasse totale de carbone trouvée dans les végétaux (Whitman *et al.*, 1998). Une étude a démontré que 90% de ces bactéries résident dans les roches du sous sol continental ou océanique (Amy, 1997). Les nombreuses espèces de bactéries souterraines qui ont été isolées vivent à des profondeurs comprises entre 4 et 7 km. Ces observations inattendues conduisent à élargir la notion de biosphère (partie de l'écorce terrestre et de l'atmosphère où il existe une vie organique).

Grâce à leur fascinante faculté d'adaptation, en partie due à leurs capacités de mutation, d'échanges génétiques et de prolifération exceptionnelles, ces organismes sont présents dans tous les biotopes rencontrés sur Terre, y compris les moins compatibles avec la vie telle que nous la concevons en tant qu'être humain. On parle dans ce cas d'organismes extrémophiles. Certaines espèces bactériennes sont ainsi capables de survivre à des températures extrêmes (supérieures à 100°C ou inférieures à 0°C...), à des pH inférieurs à 1 ou bien encore à des niveaux de radiations 5000 fois supérieurs à la dose létale pour l'homme.

Le corps humain possède dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines. Dans leur très vaste majorité, ces bactéries sont inoffensives, certaines étant même indispensables au bon fonctionnement de notre organisme (production de vitamines, protection contre la colonisation par des organismes pathogènes, éducation du système immunitaire néonatal...). Lorsqu'elles sont associées à d'autres organismes, les bactéries peuvent adopter trois modes de vie différents :

#### Le commensalisme (du latin co- : avec, et mensa : table, « compagnon de table ») :

Le commensalisme est une association neutre dans laquelle la bactérie tire profit de son hôte sans le léser. Les survies des deux organismes ne sont pas interdépendantes. Cependant, dans certains cas (immunodépression, antibiothérapie...), les organismes commensaux peuvent devenir pathogènes pour l'hôte. On parle alors de bactérie opportuniste.

La symbiose (du grec sum- : avec, et bios : vie, « qui vit avec ») :

Il s'agit d'une relation étroite et bénéfique pour les deux partenaires. Les deux organismes sont physiologiquement indépendants, mais ils assument l'un vis-à-vis de l'autre un rôle assimilable à une fonction organique.

#### Le parasitisme (du grec para- : à côté, et sitos, qui mange)

Association dans laquelle l'un des deux organismes se développe aux dépens de l'autre. Le bénéfice de la relation est unilatéral, parfois le parasite est destructeur pour son propre hôte. Les bactéries pathogènes constituent un exemple de parasitisme. On distingue les pathogènes stricts des pathogènes opportunistes. Les premiers provoquent des symptômes quel que soit l'hôte infecté alors que les deuxièmes provoquent des troubles uniquement chez les hôtes immunodéprimés.

#### I.1.2 Des animalcules au séquençage de génomes bactériens

Depuis plus de 8000 ans, les hommes ont utilisé les bactéries pour fabriquer nourriture et boisson sans qu'ils n'aient eu conscience de leur présence. Avant l'invention du microscope, bien peu de savants suspectèrent l'existence de micro-organismes. Cependant, dès l'Antiquité, le philosophe romain Lucrèce (98-55 av. JC) suggère que des êtres vivants invisibles seraient responsables de maladies. En 1546, Fracastoro, médecin et poète italien, écrit un traité sur les maladies contagieuses dans lequel il attribue la syphilis et la tuberculose à des êtres vivants invisibles capables de se multiplier. Anton van Leeuwenhoek, précurseur de la microscopie, fut le premier à observer des micro-organismes en 1680 (Figure 1), il appela ces organismes microscopiques « animalcules ».



**Figure 1 :** (A) Microscope de Leeuwenhoeck. (B) Première description de micro-organismes (animalcules) par Anton van Leeuwenhoek. Différentes morphologies bactériennes y sont représentées (bacilles, coques, spirilles).

Il faut attendre la révolution industrielle pour que les scientifiques s'intéressent de nouveau à ces micro-organismes et qu'apparaissent les premières études expérimentales. C'est également la période où de nombreux scientifiques s'opposent autour du concept de « génération spontanée ». Cette théorie affirmait que les organismes inférieurs pouvaient naître de conditions physico-chimiques particulières à partir de la matière organique. C'est Louis Pasteur qui donna le coup de grâce à ces hypothèses grâce à l'expérience du ballon à col-de-cygne (Figure 3).



**Figure 2** : Louis Pasteur combat la théorie de la génération spontanée grâce à l'expérience des ballons à col-decygne : un milieu de culture bouilli reste stérile, même dans un flacon ouvert, si le col du flacon est façonné de telle façon à ce que les poussières et autres contaminants ne puissent rentrer en contact avec le milieu.

Malgré leur découverte chez certains patients, les bactéries furent d'abord considérées comme un symptôme d'une maladie plutôt que sa cause. Agostino Bassi (1835) fut le premier à démontrer qu'un micro-organisme pouvait provoquer une maladie : il mit en évidence que la maladie du ver à soie était due à un champignon. Plus tard, Pasteur développe la « théorie des germes » qui postule qu'une maladie apparaît à cause de germes externes attaquant l'organisme. En 1876, Robert Koch fournit une preuve de la théorie des germes en isolant l'agent bactérien responsable de la maladie du charbon : *Bacillus anthracis*.

L'étude des bactéries en laboratoire révéla que divers composés chimiques sont capables de tuer les micro-organismes. Paul Ehrlich espère alors que certains ne sont pas néfastes pour les malades et permettent de les guérir. Ces travaux incitèrent Alexander Fleming à découvrir de nouveaux agents antibactériens. C'est cependant par hasard qu'il découvrit en 1928 la pénicilline en observant un halo d'inhibition autour d'une moisissure ayant contaminé une culture de *Staphylococcus*. Depuis lors, de nombreux autres antibiotiques ont été découverts, ainsi que de nombreuses résistances y étant associées...

Naturellement, les premiers travaux de microbiologie se sont concentrés sur les bactéries pathogènes ainsi que sur le traitement des maladies leur étant liées. Martinus Beijerinck et Sergei Winogradsky, grâce à leurs études sur l'implication des bactéries dans divers cycles géochimiques, ont initié la transition de cette période vers la période actuelle visant à l'étude de la biologie moléculaire d'une grande variété de micro-organismes.

Depuis cette époque, de nombreux travaux précurseurs ont permis d'approcher une nouvelle vision des bactéries. Parmi eux :

La mise en évidence de la transformation bactérienne par Frederick Griffith (1928) (transfert d'ADN bicaténaire à une bactérie réceptrice suivi de son intégration dans le chromosome).

La découverte des opérons par François Jacob et Jacques Monod (1961).

➤ La théorie de l'endosymbiose proposée par Lynn Margulis (1968), théorie selon laquelle certains organites des cellules eucaryotes proviendraient d'anciennes relations endosymbiotiques avec des bactéries.

➢ La division des procaryotes en deux groupes, eubactéries et archaebactéries par Carl Woese (1977).

> Le séquençage du premier génome bactérien en 1995.

#### I.2 Comportements sociaux chez les bactéries

Les bactéries ont longtemps été considérées comme des organismes primitifs. Ce n'est qu'au fil des découvertes scientifiques qu'elles se sont avérées être d'une complexité inattendue, organisées et douées de nombreux comportements sociaux, bouleversant ainsi la vision simpliste qui leur était associée jusqu'alors. Les scientifiques ont longtemps cru que les comportements dits « sociaux » chez les procaryotes étaient limités à certaines espèces bactériennes, telles que *Myxococcus xanthus*, une espèce bactérienne possédant la particularité de former des corps fructifères.

La majorité des espèces bactériennes de la biosphère se trouvent dans des milieux à haute densité bactérienne (sol, mer, marécages, tube digestif...), (Whitman *et al.*, 1998), elles ne sont donc pas isolées, mais cohabitent avec de nombreuses espèces différentes. De ces interactions, se sont développés de nombreux comportements dits « sociaux » ou multicellulaires. La découverte de ces comportements sociaux chez les bactéries a permis la première comparaison entre microorganismes et animaux (voir Table 2), dénotant plusieurs convergences de comportements. La coopération multicellulaire chez les bactéries est utilisée à de nombreuses fins : défense contre des espèces concurrentes, optimisation de la survie de la population ou bien encore accès à des ressources alimentaires.

	Dans le monde bactérien	Dans le monde animal
Création d'un habitat	Biofilms chez de nombreuses espèces	Terriers, nids, ruches et galeries
Chasse coopérative	Myxobacteria et autres pathogènes	Loups, lions, cafards
Individus spécialisés dans	Rhizobium, hétérocystes	Insectes sociaux (fourmis, abeilles)
l'approvisionnement	Cyanobacteries	
Individus spécialisés dans la	Myxobacteria, Escherichia coli	Pucerons, fourmis, abeilles,
défense		anémones de mer
Individus spécialisés dans la	« Swarming », corps fructifères,	Fourmis volantes, termites
dissémination	spores	
Suicide altruiste	Escherichia coli	Dards chez les abeilles
Communication via des	Quorum Sensing chez de	Phéromones chez la plupart des
phéromones	nombreuses espèces	insectes sociaux

 Table 2 : Similitudes entre les comportements sociaux bactériens et animaux. D'après Crespi, 2001.

Cette découverte a révolutionné le domaine de la microbiologie. Les prochains paragraphes décriront quelques-uns de ces phénomènes, en insistant particulièrement sur le système de communication bactérien basé sur la synthèse et la détection de petites molécules signal, comparables aux phéromones, dont le rôle sera abordé dans ce travail.

#### I.2.1 <u>Biofilm : un mode de vie longtemps sous-estimé</u>

Depuis les débuts de la microbiologie, les bactéries ont été très majoritairement étudiées en cultures pures et sous agitation. Ces conditions sont très éloignées du mode de vie naturel de la plupart des espèces bactériennes, pathogènes ou non. Les passages répétés des souches de laboratoire ont parfois conduit à la perte de certains phénotypes essentiels à la vie dans leur milieu naturel mais qui ne sont pas indispensables aux conditions classiques de culture en laboratoire (Fux *et al.*, 2005b). Ceci nous a longtemps poussé à croire que les bactéries ont un mode de vie libre (planctonique). Pourtant, il a été démontré depuis quelques années que de nombreuses espèces adoptent un mode de vie multicellulaire dans leur niche écologique. John William Costerton a proposé en 1978 le terme « biofilm » en suggérant que ce serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes (Costerton *et al.*, 1978).

Les biofilms sont décrits comme des populations bactériennes (mixtes ou non) adhérant les une aux autres et/ou à une surface ou une interface (Costerton *et al.*, 1995). Ce sont des structures tridimensionnelles complexes dont l'intégrité dépend d'une matrice extracellulaire produite par les bactéries qui les composent (Figure 3). La composition des matrices est variable d'une espèce à l'autre, elle varie parfois même au sein d'une même espèce en fonction des conditions environnementales.

Certains composants de cette matrice ont un rôle majeur dans la structure des biofilms, tels les exopolysaccharides et les protéines (Branda *et al.*, 2005 ; Nielsen, 1997 ; Sutherland, 2001). Des études récentes ont montré que l'ADN serait également un composant matriciel de nombreux biofilms (Whitchurch *et al.*, 2002 ; Spoering and Gilmore, 2006), bien que son origine et son rôle soient encore très controversés. D'autre part, Sarah Schooling a récemment démontré que de petites vésicules membranaires (produites par de nombreuses bactéries gram négatives) seraient également un composant commun des biofilms. Cette étude suggère que ces vésicules participeraient à l'intégrité de la matrice et à la sécrétion de protéines dans celle-ci (Schooling and Beveridge, 2006).



**Figure 3 :** Micrographie de microscopie électronique à balayage d'un biofilm formé par *Salmonella enterica* à l'interface air-liquide d'un milieu de culture Luria-Bertani (LB) après 3 jours d'incubation (Lasa, 2006).

Les biofilms se forment en plusieurs étapes. Tout d'abord, les bactéries planctoniques s'attachent à un substrat (biotique ou abiotique) grâce à des structures de surface (pili, flagelle, adhésines...) pouvant varier d'une espèce bactérienne à l'autre (Parsek and Greenberg, 2005). Vient ensuite la maturation du biofilm durant laquelle les bactéries vont produire la matrice extracellulaire qui permettra de structurer le biofilm et de permettre à d'autres bactéries (de la même espèce ou non) d'y adhérer. Enfin, certains signaux environnementaux ou métaboliques permettront à une partie de la population de se différencier en bactéries planctoniques. Ces bactéries pourront alors coloniser de nouvelles niches et former d'autres biofilms (Lasa, 2006). Les gènes impliqués dans la

formation et la dislocation des biofilms sont fréquemment régulés par un système de communication bactérien appelé Quorum Sensing (Parsek and Greenberg, 2005 ; Rice *et al.*, 2005 ; Hammer and Bassler, 2003 ; Spoering and Gilmore, 2006). Ce système de communication sera décrit plus loin.

Les biofilms sont des structures complexes, véritables petites « villes » bactériennes contenant une multitude de canaux aqueux permettant le passage des nutriments et l'évacuation de déchets métaboliques (Lawrence *et al.*, 1991). Il existe une véritable hétérogénéité de phénotypes au sein des biofilms, suivant leur localisation dans ces structures, les bactéries peuvent avoir des activités métaboliques très différentes (Costerton *et al.*, 1995 ; Wimpenny *et al.*, 2000 ; Davies *et al.*, 1993). Certains biofilms mixtes présentent une véritable coopération métabolique permettant a un consortium bactérien d'accéder à des ressources nutritives complexes, inaccessibles à ces mêmes espèces si elles étaient isolées (Davey and O'Toole, 2000).

Les biofilms ont été particulièrement étudiés chez les bactéries responsables d'infections chez l'homme. En effet, la moitié des maladies infectieuses touchant des patients immunodéprimés sont causées par des espèces bactériennes commensales de l'homme (*Staphylococcus epidermidis* par exemple) ou communes dans l'environnement (*Pseudomonas aeruginosa...*). Ces espèces sont capables de former des biofilms *in vivo* sur des surfaces inertes telles les prothèses, ou bien sur certains tissus vivants (poumons, endocarde...) (Costerton *et al.*, 1999). La formation de biofilms dans de telles infections pose de nombreux problèmes car la matrice entourant les bactéries au sein de ces structures fournit une protection efficace contre les défenses de l'hôte (anticorps, complément...) et contre certains antibiotiques (Fux *et al.*, 2005a). D'autre part, les biofilms facilitent les transferts horizontaux de gènes entre les bactéries et notamment le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques (Molin and Tolker-Nielsen, 2003).

#### I.2.2 Mort cellulaire programmée chez les bactéries : survie et protection

Traditionnellement, la notion de mort cellulaire programmée est associée aux organismes eucaryotes multicellulaires (le phénomène d'apoptose par exemple). Cependant, ce phénomène a récemment été observé chez différentes espèces bactériennes.

Les modules poison-antidote encodés dans le génome de nombreuses espèces constituent la forme de mort cellulaire programmée la plus étudiée chez les bactéries. Découverts grâce à l'étude du plasmide F chez *E. coli* (Ogura and Hiraga, 1983), ces systèmes sont constitués de deux gènes, le premier codant pour une toxine stable (poison), et le second pour une antitoxine labile (antidote). L'antitoxine forme un complexe stable avec la toxine, neutralisant ainsi l'effet létal de cette dernière. Mais libre, elle est rapidement dégradée par une protéase ATP-dépendante spécifique de la bactérie hôte. Si lors de la division cellulaire l'une des deux bactéries-filles perd le plasmide codant pour un système poison-antidote, cette dernière ne peut plus exprimer *de novo* l'antitoxine (Figure 4). La bactérie est alors tuée sous l'action de la toxine stable héritée de la bactérie-mère (Buts *et al.*, 2005).

D'après de récentes études, les systèmes poison-antidote chromosomiques semblent être impliqués dans la réponse aux stress. Ces systèmes seraient régulés par diverses conditions de stress et conduiraient à la mort altruiste d'une sous-population bactérienne (Engelberg-Kulka *et al.*, 2004 ; Kolodkin-Gal and Engelberg-Kulka, 2006). Cette mort altruiste permettrait la survie de la population dans son ensemble (libération de nutriments en cas de stress nutritif, protection de l'intégrité du chromosome durant un stress mutagène, protection contre les infections phagiques...). Chez *E. coli*, le système poison-antidote chromosomique le plus étudié est le système *mazEF* 

(Aizenman *et al.*, 1996). L'expression de *mazEF* est réprimée durant différentes conditions de stress (carence en acides aminés et production de (p)ppGpp,  $H_2O_2$ , température élevée...). La toxine, plus stable que l'antitoxine conduit ainsi à la mort cellulaire. *mazEF* serait donc un « module-suicide » induit durant les conditions de stress (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006).



**Figure 4 :** Système toxine-antitoxine. Le plasmide code pour une toxine et une antitoxine. Lorsqu'une bactérie acquiert ce plasmide, elle exprime la toxine et l'antitoxine (antidote). La bactérie est alors protégée de l'action de la toxine grâce au complexe toxine-antitoxine formé. L'antidote libre est continuellement dégradé par des protéases spécifiques. Si le plasmide est perdu lors de la division bactérienne, la bactérie ne peut plus produire *de novo* l'antidote, la toxine peut alors se fixer à sa cible ce qui entraîne la mort bactérienne. D'après Buts *et al.*, 2005.

La sporulation chez *Bacillus subtilis* est un autre exemple de mort cellulaire programmée. En cas de carence nutritionnelle, cette espèce s'engage dans un processus de différenciation conduisant à la sporulation. Ce processus est gouverné par la protéine régulatrice Spo0A induite en condition de limitation en nutriments (Burbulys *et al.*, 1991).

Spo0A active la transcription de deux opérons : skfA-H (codant pour un « facteur de mort extracellulaire » et une pompe d'efflux conférant la résistance à ce facteur) et sdpABC (codant pour SdpC, une protéine signal toxique). En cas de stress nutritionnel, Spo0A est activé dans une portion de la population seulement. Cette sous-population est appelée « Spo0A-ON ». Lorsque la mort par famine est imminente, les cellules « Spo0A-ON » activent l'opéron skfA-H et les bactéries produisent le facteur de mort extracellulaire qui est exporté grâce à la pompe d'efflux associée. Les cellules « Spo0A-ON » sont donc protégées de l'action létale de ce facteur, mais pas les cellules « Spo0A-OFF » qui ne produisent pas la pompe permettant son export.

Le même phénomène se déroule avec la protéine toxique SdpC produite grâce à l'activation de l'opéron *sdpABC* des bactéries « Spo0A-ON ». En effet, cette sous-population est également protégée par SdpC car ces bactéries activent l'opéron *sdpRI* codant pour les fonctions d'immunité pour SdpC. Dans les bactéries « Spo0A-OFF », cet opéron est réprimé. Durant ce phénomène de

différenciation, les deux protéines toxiques (le facteur de mort extracellulaire et SdpC) conduisent à la mort des bactéries « Spo0A-OFF » (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). Leur mort conduit à la libération de nutriments qui seront utilisés comme source nutritionnelle « d'urgence » permettant aux bactéries « Spo0A-ON » de survivre. L'équipe de Richard Losick a proposé que ce système pourrait permettre de retarder la sporulation, un processus énergétiquement coûteux et irréversible dans ses premières étapes. Si durant cette période une source nutritionnelle devenait accessible, les bactéries sporulantes seraient désavantagées par rapport aux bactéries capables de croître directement (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003).

Le phénomène de mort cellulaire programmée a également été mis en évidence au sein des biofilms (Webb *et al.*, 2003). Cette mort altruiste permettant la survie aux centres des microcolonies où de nombreuses conditions de stress, telle la famine, peuvent être rencontrées.

#### I.2.3 La coopération pour subvenir aux besoins nutritionnels

L'étude de la bactérie Gram négative *Myxococcus xanthus* a considérablement contribué à la compréhension des comportements sociaux chez les bactéries (Dworkin, 1996). Cette espèce bactérienne est surtout connue pour sa capacité à former, en condition de famine, des corps fructifères (structures composées d'environ 10<sup>5</sup> bactéries). Au sein de ces structures, seule une petite sous-population se différenciera en spores résistantes aux stress. Les autres bactéries entameront un « suicide collectif », dernier sacrifice nécessaire à la formation des spores.

D'autre part, à l'image de certaines espèces animales, tels les prédateurs chassant en groupe, *M. xanthus* est capable de coordonner des attaques massives contre des proies bactériennes et de croître grâce aux nutriments libérés. Il a récemment été montré qu'en présence de différentes proies ou macromolécules, *M. xanthus* utilise un mode de déplacement particulier appelé « rippling » (Berleman *et al.*, 2006). Durant le « rippling », les bactéries s'organisent en lignes parallèles. Le mouvement coordonné des bactéries perpendiculairement à l'axe des lignes créé un mouvement de « vagues ». Lorsque deux « vagues » entrent en contact, le renversement des cellules bactériennes est induit de façon à ce chaque « vague » oscille entre les « vagues » voisines. Il a été proposé que *M. xanthus* stimule le phénomène d'oscillation afin de s'assurer que toutes les proies disponibles sont consommées (Berleman *et al.*, 2006) (voir Figure 5).



**Figure 5 :** Comportement prédateur de *M. xanthus* (en haut + encre de Chine) en présence d'*E. coli* (en bas) sur milieu gélosé. *M. xanthus* nage jusqu'à la colonie proie d'*E. coli* (A). La lyse des proies à lieu dès le contact direct entre les deux espèces bactériennes. Le déplacement sous forme de « vagues » oscillantes appelé « rippling » est alors activé (B), puis désactivé une fois la colonie lysée traversée (C). D'après Berleman *et al.*, 2006.

La réponse de certaines cyanobactéries à une carence en azote est un autre exemple de coopération « suicide » à des fins nutritionnelles. *Anabaena* est une espèce formant de longues chaînettes. En condition de carence en azote, environ une bactérie sur 10 se différencie en hétérocyste (voir Figure 6), une cellule spécialisée dans la fixation d'azote atmosphérique, mais incapable de se diviser (Zhang *et al.*, 2006).



**Figure 6 :** Formation d'hétérocystes par *Anabaena*. A : Culture en présence de source d'azote. B : Culture en conditions de carence en azote. Les flèches indiquent les hétérocystes. D'après Zhang *et al.*, 2006.

#### I.2.4 L'union fait la force, ou comment les bactéries communiquent

L'étude des comportements sociaux chez les bactéries a été initiée par la découverte des biofilms (voir paragraphe I.2.1) et du système de communication bactérien appelé Quorum Sensing (QS) (voir paragraphe I.3).

Au sein d'un organisme eucaryote supérieur, les cellules communiquent entre elles soit par contact direct, soit par le biais de molécules chimiques. La communication intercellulaire basée sur les signaux chimiques est essentielle au fonctionnement des systèmes nerveux, immun et neuroendocrinien ainsi qu'à la connexion de ces différents systèmes entre eux. Cette coordination est basée sur l'utilisation de médiateurs, petits messagers rapidement diffusibles incluant les catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine), les indoles (sérotonine et mélatonine), les cytokines, les hormones, l'histamine ou encore l'acétylcholine.

On peut d'une certaine façon comparer ces systèmes de communication au système de QS bactérien puisque celui-ci est également basé sur la synthèse, l'émission et la détection de petites molécules diffusibles et permet à une population bactérienne d'adopter un comportement coordonné. Le système de Quorum Sensing a fait l'objet de ce travail et sera donc plus amplement détaillé dans le chapitre suivant.

#### I.3 La communication bactérienne

Comme nous le verrons ci-après, les systèmes de QS utilisés par les bactéries à Gram-positif et par les bactéries à Gram-négatif sont différents. Durant ce travail nous nous somme attachés à caractériser une partie du système de communication de *Brucella melitensis*, une bactérie pathogène intracellulaire à Gram-négatif. C'est pourquoi ce chapitre décrira plus précisément les mécanismes moléculaires du QS utilisés par ce groupe bactérien.

#### I.3.1 La découverte de la communication bactérienne

La découverte de la communication bactérienne débuta dans les années 1970 lorsque J. W. Hastings entana l'étude de la luciférase de *Vibrio fischeri*, une protéine conférant un phénotype

bioluminescent à cet organisme. *V. fischeri* est une bactérie marine Gram négative capable, dans le cadre d'une relation symbiotique, de coloniser l'organe lumineux spécialisé du calmar *Euprymna scolopes*. Le calmar fournirait un environnement riche en nutriments à *V. fischeri*, qui par la production de lumière permettrait à son hôte de se camoufler grâce au phénomène de contreillumination (l'ombre du calamar est masquée grâce au phénomène de bioluminescence), (Ruby, 1996).

Hastings fut intrigué par le fait que la luciférase ne soit produite en grande quantité qu'en fin de phase logarithmique de croissance. Il mit en évidence quelques années plus tard que l'induction de la synthèse de luciférase est due à la présence d'un composé diffusible s'accumulant au cours de la croissance dans le milieu de culture. Il appela ce composé « autoinducteur » (Hastings and Nealson, 1977).

L'autoinducteur produit par V. *fischeri* active la production de luciférase seulement lorsqu'une certaine densité bactérienne est atteinte. C'est pourquoi il a été suggéré que V. *fischeri* utiliserait ce système d'autoinduction afin de détecter la haute densité bactérienne atteinte uniquement dans les organes lumineux  $(10^{10} à 10^{11} bactéries/ml)$  et de ne déclencher la production de luciférase qu'à cet endroit, où la luminescence est nécessaire à la relation symbiotique le liant à son hôte. Le concept de communication bactérienne fut à l'époque accueilli avec scepticisme...

Il fallut attendre les années 1980 pour préciser ce système d'autoinduction. La structure de l'autoinducteur produit par *V. fischeri* fut alors résolue : il s'agit d'une 3-oxo-hexanoyl homosérine lactone (Eberhard *et al.*, 1981), une molécule de type *N*-acyl-L-homosérine lactone ou AHL (voir Figure 7). Grâce à son caractère amphiphile, cette molécule diffuse librement de part et d'autre de la membrane bactérienne. En 1984, Engebrecht démontra que l'induction de l'expression de la luciférase nécessite deux gènes : *luxI* codant pour une protéine nécessaire à la synthèse de l'autoinducteur, et *luxR*, codant pour un régulateur transcriptionnel répondant à la présence d'autoinducteur (Engebrecht and Silverman, 1984).

L'ensemble de ces découvertes a conduit au modèle présenté en figure 7 : lorsque *V. fischeri* est à l'état libre, LuxI produit constitutivement un niveau basal d'autoinducteurs qui diffusent dans le milieu marin. Lorsque la bactérie entre dans l'espace confiné que constitue l'organe lumineux d'un calmar, les autoinducteurs s'accumulent au fur et à mesure que la population bactérienne croît. L'augmentation de la concentration en AHLs conduit à leur liaison sur le régulateur LuxR qui, alors activé, se lie à des séquences palindromiques spécifiques sur l'ADN, appelées « *lux box* ». L'ARN polymérase est ensuite recrutée, ce qui permet l'activation de la transcription de l'opéron *lux* (Egland and Greenberg, 1999).

Depuis cette époque, de nombreuses études ont permis d'affiner ce modèle. D'autre part, le séquençage de nombreux génomes bactériens ainsi que la disponibilité d'outils génétiques permettant la détection d'AHLs dans les milieux de culture bactériens ont permis de démontrer que les systèmes de communication basés sur les AHLs et les protéines LuxI/LuxR sont répandus chez de nombreuses espèces Gram négatives. Cependant ces systèmes de communication ne sont pas conservés chez certaines classes telles les δ-protéobactéries et les ε-protéobactéries (Manefield and Turner, 2002). Il existe une grande variété d'AHLs (voir point I.4.1), aussi appelées autoinducteurs de type I (AI-1), de ce fait il a été initialement proposé que chaque espèce bactérienne est capable de produire une AHL spécifique permettant une communication intra-espèce. Cependant, on sait dorénavant que quelques espèces produisent les mêmes AHLs, suggérant la possibilité de communication croisées entre ces dernières si elles se rencontrent.



**Figure 7 :** Principe du Quorum Sensing chez *V. fischeri.* L'enzyme LuxI est responsable de la synthèse de petites molécules diffusibles appelées acyl homosérine lactones ou AHLs (triangles). Ces molécules s'accumulent au cours de la croissance de la population bactérienne. Lorsque la densité de la population atteint un certain seuil (ou quorum), les autoinducteurs se lient au régulateur LuxR qui va alors activer la transcription de l'opéron *luxICDABE* codant pour des protéines impliquées dans le phénomène de bioluminescence chez cette bactérie La structure générale des AHLs est présentée dans l'encart en haut à droite. D'après Waters and Bassler, 2005b.

#### I.3.2 Les types différents types de communication utilisés par les bactéries

Aux débuts des études menées sur ce sujet, on imaginait que les systèmes de communication inter-bactériens ne permettaient l'échange de signaux qu'entre bactéries de la même espèce, nous savons aujourd'hui que c'est loin d'être le cas... Il est possible de distinguer différents types de communication bactérienne en considérant les acteurs qu'ils mettent en jeu. Ainsi, il existe trois familles d'autoinducteurs : AI-1, AI-2 et AI-3, il est généralement admis que ces molécules sont dédiées respectivement aux communication intra-espèce, inter-espèce et inter-règne, bien que certaines nuances doivent être prises en compte. Par exemple, le fait que plusieurs espèces soient capable de produire la même AHL complique la classification de ces molécules dans la catégorie de molécule signal intra-espèce. Ces différents types de communication seront décrits dans les prochains paragraphes.

#### I.3.2.1 AI-1 : Communication intra-espèce

Nous distinguerons les systèmes de communication bactériens intra-espèce concernant les espèces bactériennes à Gram négatif d'une part et ceux qui concernant les espèces à Gram positif d'autre part. En effet, les bactéries Gram positives utilisent des systèmes basés sur la détection de signaux de type oligopeptide tandis que les bactéries Gram négatives utilisent des systèmes basés sur la détection de signaux de type AHL. Toutefois, il est important de préciser que les AHLs et les oligopeptides sont loin d'être les seules molécules signal utilisées lors de communication bactérienne intra-espèce (Visick and Fuqua, 2005). En effet, ces dernières années, une grande variété de molécules signal a été décrite et les fonctions régulées par ces molécules sont tout aussi variées (voir Table 3).

Par exemple, *M. xanthus* utilise cinq signaux différents pour coordonner différents comportements sociaux (voir paragraphe I.2.3) (Kaiser, 2004). La nature chimique de tous ces signaux n'a pas encore été résolue. Cependant le signal A est constitué d'un mélange d'acides aminés et est impliqué dans l'agrégation et la sporulation. Le signal C est une protéine de 17 kDa impliquée dans la formation des corps fructifères (Dworkin, 1996). De même, le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, qui constitue une des modèles de communication

Signaux	Organisme s	Synthèse	Récepteur	Fonctions régulées	Références
Acyl homosérines lactones (AHLs)	Proteobacteria	Luxl AinS	Régulateurs de type LuxR	Biofilms, conjugaison, facteurs de virulence	Fuqua and Greenberg, 2002
Oligopeptides linéaires et cycliques	Bactéries Gram positives	Codés par le génome	Systèmes deux composants, phosphorelais	Compétence, production d'antibiotiques, sporulation, facteurs de virulence	Dunny and Leonard, 1997
γ-Butyrolactones (GBLs)	Streptomyces spp.	AfsA-type GBL synthase	Répresseur ArpA, GBL-binding protein	Métabolisme secondaire, production d'antibiotiques, sporulation	Horinouchi, 2002
Acide <i>cis</i> -11- Methyl-2- dodecenoique (DSF)	Xanthomonas spp.	RpfB, RpfF	RpfC, RpfH	Virulence et pigmentation	Wang <i>et al.,</i> 2004
4-Hydroxy-2-alkyl quinolones (PQS, HAQs)	Pseudomonas aeruginosa	PqsABCDE PqsH, PqsL	Ş	Régulation globale, pyocyanine, virulence	Déziel <i>et al.,</i> 2005 Lépine <i>et al.,</i> 2004
2-heptyl-4- quinolone (HHQ)	a) Pseudomonas aeruginosa b) Burkholderia pseudomallei	PqsABCDE HhqABCDE	PqsR ?	a) <i>pqsA, lecA</i> b) Production d'exoprotéase ; Morphologie des colonies	a) Diggle et al. 2006a, Xiao et al., 2006 b) Diggle et al. 2006b
Methyl esters d'acide palmitique	Ralstonia solanacearum	PhcB	Régulateur PhcR	Virulence, production d'exopolysaccharide	Flavier et al., 1997a
Putrescine	Proteus mirabilis	SpeA, SpeB	Ş	Swarming motility	Sturgill and Rather, 2004
A-Signal (acides aminés)	Myxococcus xanthus	Protéase AsgAB	Protéines SasS/SasR/SasN	Agrégation	Kaiser, 2004
C-Signal	Myxococcus xanthus	Produit de traduction	FruA ?	Formation de corps fructifères, swarming	Kaiser, 2004
Dipeptides cycliques	Nombreuses espèces	?	Protéines de type LuxR ?	Métabolisme secondaire	Holden <i>et al.,</i> 1999

bactérienne les plus étudiés, produits différents types d'AHLs ( $C_4$ -HSL et 3-oxo- $C_{12}$ -HSL) ainsi qu'une quinolone (Pesci *et al.*, 1999) appelée PQS (pour *Pseudomonas* quinolone signal).

**Table 3:** Quelques exemples de molécules signal utilisées lors de communications intra-espèce. D'après Visick and Fuqua, 2005.

Cette variété de signaux a conduit à la définition de quatre critères fondamentaux permettant de désigner une molécule « autoinducteur » (Winzer *et al.*, 2002) :

- La molécule signal doit être produite durant une étape spécifique de croissance, dans certaines conditions physiologiques ou en réponse à des changements environnementaux.
- La molécule signal doit s'accumuler dans le milieu extracellulaire et être détectée par un récepteur spécifique
- Une fois une concentration seuil atteinte, la molécule signal doit générer une réponse concertée de la population.
- La réponse cellulaire doit aller au-delà des changements physiologiques nécessaires à la production ou la dégradation de la molécule signal.

La diversité des signaux pouvant être synthétisés et/ou intégrés par chaque espèce bactérienne complexifie considérablement le modèle présenté en Figure 7. De nombreuses espèces sont capables de produire plusieurs types d'AHLs et d'intégrer indépendamment ces signaux. C'est par exemple le cas de *Pseudomonas aeruginosa* qui utilise deux types de molécules signal pour activer ses facteurs de virulence. Ces signaux sont détectés spécifiquement par deux régulateurs de type LuxR différents. Le système LasI/LasR est responsable de la synthèse et de la détection de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL alors que le système RhII/RhIR est responsable se la synthèse et de la détection de la C<sub>4</sub>-HSL. Les systèmes Las et Rhl sont organisés de façon hiérarchique : le système Las permet l'activation transcriptionelle du système RhI (Passador *et al.*, 1993 ; Latifi *et al.*, 1995).

Suivant leur nature, ces molécules signal sont intégrées différemment par les bactéries (Figure 8). Par exemple, la différence d'intégration des signaux de type AHL et de type oligopeptides est l'une des différences majeures entre les systèmes de communication des espèces Gram négatives et Gram positives. Alors que les AHLs diffusent librement à travers la membrane (voie 2a sur la figure 8), les oligopeptides sont détectés par des récepteurs de surface appartenant à la famille des systèmes à deux composants (voie 1b sur la figure 8).



**Figure 8 :** Mécanismes de détection des molécules signal. Les voies 1a et 1b impliquent une détection externe du signal, soit *via* l'interaction d'une protéine intermédiaire avec la molécule signal puis avec un récepteur transmembranaire (1a), soit directement avec le récepteur transmembranaire (1b), L'effet du signal sur les gènes cibles est répercuté à l'intérieur de la bactérie. Les voies 2a et 2b sont basées sur la diffusion passive de la molécule signal à travers la membrane (2a) ou l'import de cette molécule par un système de transport spécifique (2b). Dans les deux cas, l'autoinducteur interagit directement avec un régulateur qui, alors activé, modulera l'expression de gènes cible. D'après Visick and Fuqua, 2005.

#### I.3.2.1.1 Exemple de QS chez les bactéries Gram positive : *Staphylococcus aureus*

Chez les bactéries à Gram positif, les signaux oligopeptidiques (de 5 à 17 acides aminés) sont issus de la maturation d'une protéine précurseur. Dans certains cas, des maturations post-traductionnelles ont lieu (ajout de groupements, formation de liaisons intramoléculaires...). L'oligopeptide est sécrété par un transporteur de type « ATP-binding cassette » (ABC). Les oligopeptides s'accumulent alors dans le milieu de façon dépendante de la densité de population. Une fois une concentration seuil atteinte, ils seront fixés par la protéine senseur d'un système à deux composants, spécifique de l'oligopeptide. La transduction du signal se fait ensuite par une cascade de phosphorylation-déphosphorylation qui conduit à l'activation du régulateur de réponse final, qui régulera en conséquence l'expression de gènes particuliers (Novick, 2003), (Figure 9).



**Figure 9:** Modèle général du Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif. L'oligopeptide est maturé à partir d'une protéine précurseur, puis exporté via un système ABC transporteur. Une fois la concentration seuil atteinte, les oligopeptides sont détectés par le domaine senseur d'un système à deux composants. Cette fixation déclenche alors une cascade de phosphorylation-déphosphorylation qui conduira à l'activation d'un régulateur de réponse. Ce dernier régulera alors l'expression de gènes cible. D'après Miller and Bassler, 2001.

Ce type de mécanisme peut être illustré par le système de communication utilisé par *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie commensale peut devenir un pathogène parfois mortel lorsqu'elle pénètre dans les tissus de l'hôte. *S. aureus* utilise une stratégie biphasique lors de l'infection. À faible densité de population, cette bactérie exprime des facteurs protéiques permettant l'attachement aux cellules hôte et la colonisation (Lyon and Novick, 2004), à haute densité de population, elle réprime ces facteurs et active la sécrétion de toxines et de protéases nécessaires à la dissémination des bactéries. Dans ce dernier cas, ces changements d'expression sont régulés par le système de Quorum Sensing Agr.

Le système Agr est constitué du polypeptide AIP codé par le gène *agrD*, du système à deux composants AgrC/AgrA et de la protéine AgrB qui exporte et ajoute un cycle thiolactone aux AIPs (Saenz *et al.*, 2000), (voir figure 10). Les gènes *agrA*, *B*, *C* et *D* font partie du même opéron (opéron *agrBDCA*). La liaison du peptide AIP au senseur AgrC conduit à la phosphorylation d'AgrA (AgrA~P). AgrA~P induit alors l'expression d'un ARN régulateur (RNAIII) qui va conduire à la répression de l'expression des facteurs d'adhérance et à l'activation de l'expression des facteurs sécrétés (Novick *et al.*, 1993, voir Figure 10). AgrA~P active également l'expression de l'opéron *agrBDCA*, ce qui va provoquer l'augmentation de la concentration de l'oligopeptide AIP. Ceci permet de s'assurer que la totalité de la population passe d'un état « faible densité de population » à l'état « haute densité de population ».



**Figure 10 :** *Staphylococcus aureus* utilise le système à deux composants AgrC/AgrA pour détecter et répondre à l'oligopeptide AIP (petits cercles rouges). AIP est codé par *agrD* et exporté et modifié par la protéine AgrB. P2 et P3 désignent respectivement le promoteur de l'opéron *agrBDCA* et le promoteur de RNAIII. D'après Waters and Bassler, 2005

Ainsi, quatre classes de souches de *S. aureus* ont été définies sur base de la séquence de leur peptide AIP. De façon intéressante, chaque AIP active le récepteur AgrC qui lui est spécifique, mais inhibe l'activation de tous les autres par liaison compétitive, bloquant la cascade d'activation des facteurs de virulence des trois autres groupes de *S. aureus*. Il existe donc une compétition intraespèce. Lors d'une co-infection, c'est le groupe qui active en premier sa cascade de régulation QSdépendante qui prendra le dessus (Waters and Bassler, 2005). Il a d'ailleurs été montré que chacun des quatre groupes de *S. aureus* est la cause majeure d'un type spécifique d'infection, par exemple la majorité des souches causant des syndromes de choc toxique appartiennent à la classe III. Ces observations suggèrent que le système de QS Agr aurait pu être déterminant dans l'établissement d'une niche spécifique à chaque groupe (Novick, 2003).

#### I.3.2.1.2 Exemple de QS chez une bactérie Gram négative : Agrobacterium tumefaciens

Le modèle classique de communication basé sur la synthèse et la détection d'AHLs a été présenté paragraphe I.3.1. Chaque élément de ce type de système de communication sera détaillé plus amplement dans le chapitre I.4. Nous avons choisi ici de présenter ici le système de QS de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*. Cette  $\alpha$ -protéobactérie est responsable de la galle du collet (chez les dicotylédones essentiellement), causée par une tumeur au site d'infection. Ces tumeurs sont formées suite à l'insertion dans le chromosome des cellules végétales d'un fragment d'ADN bactérien (ADN-T) provenant du plasmide Ti (Tumor-inducing) (Zhu *et al.*, 2000). Le plasmide Ti est transféré directement dans le cytosol des cellules végétales grâce à un système de sécrétion de type IV. Les gènes portés par l'ADN-T s'expriment dans le végétal et conduisent d'une part à la synthèse d'hormones de croissance végétales conduisant à la multiplication anarchique des cellules végétales (d'où la formation de tumeurs) et d'autre part à la synthèse de composés appelés opines (Kim and Farrand, 1996). Ces composés serviront de nouvelles sources de nutriments pour *Agrobacterium*.

Le transfert conjugatif du plasmide Ti entre les *Agrobacterium* est sous le contrôle d'un système de QS (Piper *et al.*, 1993). Ce système est constitué de l'enzyme TraI, responsable de la synthèse de la *N*-(3-oxoctanoyl)-homosérine lactone, et du régulateur transcriptionnel TraR, capable de lier spécifiquement cette AHL (Vannini *et al.*, 2002 ; Zhu and Winans, 1999), (voir Figure 11). Les protéines TraI et TraR sont codées par les gènes *traI* et *traR* localisés sur le plasmide Ti.



**Figure 11 :** Régulation du transfert conjugatif du plasmide Ti chez *A. tumefaciens*. Les opines (triangles) induisent la synthèse du régulateur transcriptionnel TraR en inhibant le répresseur AccR (cercle). En présence de haute concentration en AHLs (pentagones) produites par TraI, TraR active le régulon *tra* (gènes nécessaires au transfert conjugatif du plasmide Ti). L'anti-activateur TraM titre l'activité de TraR en présence de haute concentration en AHLs. D'après Von Bodman *et al.*, 2003.

Les opines produites par la plante permettent d'initier la cascade du QS. Il existe deux type d'opines : les octopines, qui conduisent à l'activation de TraR *via* la protéine activatrice OccR, et les agrocinopines qui activent l'expression de TraR en inactivant le répresseur AccR. Ainsi, le système de QS d'*Agrobacterium* est dépendant à la fois des signaux bactériens (QS) et des signaux de l'hôte (opines), (voir Figure 11). Le régulon TraR comporte deux opérons (*traI-trb*) qui codent pour les protéines structurales permettant le transfert du plasmide Ti, et pour la protéine TraI (créant ainsi une boucle de régulation positive pour *traI*). TraR active également l'expression du gène *traM* codant pour un anti-activateur se fixant au domaine C-terminal de TraR (Luo *et al.*, 2000)

D'autres niveaux de régulation complètent ce système. Par exemple, le génome d'A. *tumefaciens* code pour la protéine AttM, une enzyme (AHL lactonase) capable de dégrader les AHLs produites par cette bactérie (Dong *et al.*, 2001). Ainsi la concentration d'AHLs diminue en début de phase stationnaire, tout comme la fréquence de conjugaison du plasmide Ti. D'autre part, la liaison des AHLs à TraR permet de protéger TraR de la protéolyse (Zhu and Winans, 2001).

Les tumeurs contiennent un quantité significative d'*Agrobacterium* avirulents (ayant perdu le plasmide Ti), ces bactéries semblent avoir un avantage de croissance sur les bactéries possédant le plasmide. Il a été proposé que lorsque les nutriments deviennent limitants et que la population bactérienne s'accroît, le système de QS permettrait à cette population d'acquérir le plasmide par conjugaison et ainsi augmenter la quantité d'opines produites par la plante, source de nutriments précieuse pour *Agrobacterium* (Von Bodman *et al.*, 2003).

#### I.3.2.2 AI-2 : Communication inter-espèce

L'étude du système de communication utilisé par Vibrio harveyi, une espèce proche de V. *fischeri*, a conduit à l'identification d'un deuxième type d'autoinducteur, désigné AI-2 (Bassler *et al.*, 1993). Une étude structurale a révélé qu'il s'agit d'un furanosyl borate diester (Chen *et al.*, 2002). Cette molécule est synthétisée en deux étapes enzymatiques (catalysées respectivement par l'enzyme Pfs et l'enzyme LuxS) à partir de la S-adénosyl-homocystéine (SAH). Il en résulte la 4,5-dihydroxy 2,3 pentanedione (DPD), une molécule instable qui subit spontanément une étape de

cyclisation puis se complexe avec un atome de Bore (dans le cas de *V. harveyi*) pour former la molécule de type AI-2 (Schauder *et al.*, 2001). Le gène *luxS* est conservé chez de nombreuses espèces bactériennes (voir figure 12).



**Figure 12 :** Arbre phylogénétique basé sur la séquence de la protéine LuxS. Cet arbre a été réalisé à partir des génomes actuellement séquencés. L'arbre a été construit grâce à la méthode neighbour-joining après alignement des gènes orthologues. D'après Sun *et al.*, 2004.

Le mécanisme de détection des molécules de type AI-2 a été décrit chez V. fischeri et S. typhimurium. Chez V. fischeri, les molécules de type AI-2 sont détectées par le senseur membranaire LuxP (Chen et al., 2002). Chez Salmonella, AI-2 est transporté à l'intérieur de la bactérie grâce au système de transport Lsr (ABC transporteur codé par l'opéron *lsrACDBFGE*) (Taga et al., 2001). Une fois internalisé, AI-2 est phosphorylé par la protéine LsrK et entraîne l'inactivation de LsrR, un répresseur qui contrôle l'expression des gènes *lsrACDBFGE* et du gène *lsrK*. Cette levée de répression « en cascade » conduit à l'augmentation de l'import d'AI-2

(Vendeville *et al.*, 2005).Chez *E. coli*, les signaux de type AI-2 affectent un régulon représentant 5 à 10% du génome (Sperandio *et al.*, 1999 ; DeLisa *et al.*, 2001). L'étude de mutants *luxS* dans différentes espèces bactériennes à conduit à l'identification de très nombreux phénotypes régulés par AI-2 (Federle and Bassler, 2003), par exemple:

L'expression de facteurs de virulence chez *Escherichia coli* (Sperandio *et al.*, 1999),
 Streptococcus pyogenes (Lyon *et al.*, 2001) et *pneumoniae* (Stroeher *et al.*, 2003) ou encore
 Vibrio cholerae (Zhu *et al.*, 2002).

La production d'antibiotiques chez *Photorhabdus luminescens* (Derzelle *et al.*, 2002).

La mobilité chez *Campylobacter jejuni* et *E. coli* (DeLisa *et al.*, 2001).

La formation de biofilms chez *Porphyromonas gingivalis* (McNab *et al.*, 2003), *Salmonella typhi* (Prouty *et al.*, 2002), et *Streptococcus mutans* (Merritt *et al.*, 2003).

L'activation de souches senseurs basées sur le système de détection d'AI-2 de *V. harveyi* par des surnageants de cultures de nombreuses espèces bactérienne a conduit à l'hypothèse que les molécules de type AI-2 seraient impliquées dans la communication inter-espèce (Bassler, 1999, 2002). Elle pourrait ainsi permettre aux bactéries, dans des niches colonisées par plusieurs espèces, d'estimer la taille totale de la population. Certaines espèces bactériennes sont capables à la fois de produire des molécules de types AI-2 (communication inter-espèce) et de type AI-1 (communication intra-espèce). Il a été proposé que l'intégration de ces deux systèmes de communication pourrait être utilisé afin d'estimer la proportion que représente leur espèce au sein de la population totale (Federle and Bassler, 2003).

*V. harveyi* est un bon exemple d'intégration de différents types de signaux. Cette bactérie est capable de détecter deux types de molécules signal: AI-1 (AHL) et AI-2 (voir Figure 13). Chaque type de molécule est détectée par la protéine senseur d'un système à deux composants qui lui est spécifique (ce qui représente un cas particulier de détection de molécules de type AHLs qui sont habituellement détectées dans la cellule bactérienne). Ces systèmes convergent afin de réguler la formation de biofilm, la bioluminescence ou encore l'appareil de sécrétion de type III.

En absence d'autoinducteur, les senseurs se comportent comme des kinases, elles s'autophosporylent sur un résidu histidine conservé puis transfèrent le groupement phosphate sur le résidu aspartate conservé de leur domaine régulateur de réponse. Le phosphate est séquentiellement transféré sur une histidine de la phosphotransférase LuxU (Freeman and Bassler, 1999) puis sur l'aspartate conservé du régulateur de réponse LuxO. LuxO~P réprime alors directement l'opéron *luxCDABE*, et donc la production de bioluminescence (Federle and Bassler, 2003 ; Bassler *et al.*, 1994).

En présence de l'un des deux types d'autoinducteurs, les protéines senseurs acquièrent une activité phosphatase qui conduit à l'inactivation de LuxO, à la dérépression de l'opéron *luxCDABE* et donc à l'activation du phénomène de bioluminescence. Chez *V. harveyi*, quatre situations distinctes peuvent être rencontrées : la présence d'AI-1 seulement, d'AI-2 seulement, des deux types d'autoinducteur, ou bien d'aucun type d'autoinducteur.

Il a été démontré que grâce à ces systèmes parallèles, *V. harveyi* est capable de distinguer chacune de ces quatre situations (Mok *et al.*, 2003). Il a été proposé que ce système permettrait de réduire la sensibilité du réseau de régulation et ainsi éviter des perturbations dues à la synthèse de molécules signal semblables ou à la dégradation de l'une d'entre elles par d'autres espèces

bactériennes présentes dans le milieu environnant. Une hypothèse alternative serait que la capacité de *V. harveyi* à détecter les fluctuations de plusieurs molécules signal et à répondre en conséquence (Waters and Bassler, 2006) pourrait être critique pour sa survie dans différentes niches écologiques.



**Figure 13 :** Système de QS chez *V. harveyi* : Deux systèmes à deux composants parallèles permettent la détection d'AI-1 (AHL) synthétisées par l'enzyme LuxLM et d'AI-2 synthétisée par LuxS. À faible densité de population, LuxN et LuxPQ agissent comme des kinases qui conduisent, *via* une chaîne de phosphorylation, à l'activation du répresseur LuxO. LuxO réprime alors la transcription de l'opéron *luxCDABE* et donc la bioluminescence. À haute densité de population, la liaison des autoinducteurs à LuxN ou LuxPQ entraîne la conversion de leur activité kinase en activité phosphatase. L'inactivation subséquente de LuxO conduit à la dérépression de l'opéron *luxCDABE*. Le régulateur transcriptionnel LuxR (différent de LuxR de *V. fischeri*) est nécessaire à l'expression de l'opéron *luxCDABE*. D'après Federle and Bassler, 2003.

#### I.3.2.3 AI-3 : Communication inter-règne

Récemment, Vanessa Sperandio a démontré chez une *E. coli* entérohémorragique (EHEC) l'existence d'un nouveau type de molécule signal (dénommé AI-3) dont la structure est encore inconnue (Sperandio *et al.*, 2003). Les EHEC sont responsables de nombreuses épidémies alimentaires. Elles provoquent la formation de lésions sur les cellules épithéliales intestinales appelées lésions d'attachement-effacement (lésion AE). Ces lésions sont caractérisées par la destruction des microvillosités et le réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte pour former des structures en piédestal capables de recueillir individuellement le pathogène (voir Figure 14).



Figure 14 : Lésion d'attachement-effacement causée par une EHEC (flèche). On observe l'effacement des microvillosités ainsi que la formation d'une structure en piédestal (étoile). D'après Pedroso *et al.*, 1993.

Les gènes impliqués dans la formation de ces lésions sont situés dans un îlot de pathogénicité appelé LEE (locus of enterocyte effacement). Ce locus est en partie constitué des gènes codant pour
un appareil de sécrétion de type III, responsable de l'injection de facteurs de virulence (effecteurs) directement dans la cellule hôte. Certains de ces effecteurs, tels que la protéine Tir, sont nécessaires à la formation de la structure en piédestal (Roe *et al.*, 2003).

Il a démontré que les molécules AI-3 régulent la mobilité bactérienne ainsi que l'activation du système de sécrétion de type III. L'épinéphrine ou la norépinéphrine peuvent se substituer aux molécules de type AI-3 dans la régulation de ces facteurs de virulence, suggérant une cross-communication entre les hormones produites par l'hôte (présentes dans l'intestin) et les autoinducteurs produits par la bactérie (Sperandio *et al.*, 2003). D'autre part l'ajout d'un antagoniste de récepteur adrénergique bloque l'effet des hormones ainsi que celui des AI-3, suggérant que ces composés pourraient partager certaines caractéristiques structurales (Sperandio *et al.*, 2003).

Une étude récente a permis d'établir que ces deux types de molécules sont reconnues par un même récepteur, le senseur kinase QseC faisant partie du système à deux composant QseBC (Clarke *et al.*, 2006) (voir Figure 15). Une mutation dans ce récepteur conduit à une perte de virulence *in vivo*. QseC constituerait donc un récepteur adrénergique bactérien activant certains gènes de virulence en réponse à des signaux inter-règne.

Un deuxième système à deux composants impliqué dans la détection d'AI-3/épinéphrine/norépinéphrine a été mis en évidence chez *E. coli*, le système QseEF (voir Figure 15). Ce système est impliqué dans la cascade de régulation conduisant à l'activation de *espFu* (un effecteur du système de sécrétion de type III) conduisant à la polymérisation d'actine durant la formation des lésions AE (Reading *et al.*, 2007).



**Figure 15 :** Schéma de la communication AI-3/épinéphrine/norépinéphrine chez *E. coli* entérohémorrahique (EHEC). Ces molécules signal sont détectées par deux senseurs insérés dans la membrane des EHEC : QseC et QseF. QseBC régule flagelle et la mobilité alors que QseEF participe à la régulation de la formation des lésions AE en conjonction avec d'autres régulateurs.

Il a été démontré que la mutation du gène *luxS* (codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'AI-2) entraîne une diminution de la production d'AI-3. Ce phénotype ainsi que

l'atténuation de la virulence d'une souche EHEC mutée dans *luxS*, sont en fait dus à des altérations du métabolisme (Walters *et al.*, 2006). La voie de biosynthèse de ce nouveau type de molécule signal n'est pas encore connue. Le domaine senseur périplasmique de QseC est conservé chez plusieurs espèces bactériennes, tout comme la production d'AI-3 (Clarke *et al.*, 2006 ; Walters *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que ce type de communication peut être utilisé par d'autres bactéries, mais également que ces molécules pourraient, aux même titre que les AI-2, être utilisée lors de communications inter-espèce.

#### I.3.3 Évolution du concept de communication bactérienne et point de vue évolutif

La fonction de la communication chez les bactéries est encore très controversée. Plusieurs hypothèses ont été formulées afin de répondre aux questions suivantes : de quoi dépend la concentration en autoinducteurs dans le milieu ? Que représente la mesure de la concentration d'autoinducteurs pour les bactéries ? Quel serait l'avantage sélectif d'un tel système ? Actuellement, trois hypothèses, non exclusives, ont été proposées. Elles sont présentées dans les paragraphes suivants.

#### I.3.3.1 Quorum Sensing

Quelques temps après sa découverte, le phénomène de communication bactérienne a été nommé Quorum Sensing (Fuqua *et al.*, 1994). Tous les phénotypes régulés par ce type de communication connus à cette époque ne semblaient avoir de sens que s'ils étaient exprimés de façon coordonnée par un grand nombre de bactéries lors d'une interaction avec un hôte animal ou végétal. Ainsi, il a été proposé que la réponse bactérienne concertée ne serait déclenchée que lorsqu'un certain nombre de bactéries (ou quorum) serait atteint (Voir Figure 16) et ce système serait utilisé afin de permettre aux bactéries de détecter les situations où il est intéressant d'exprimer un phénotype. Par exemple, certains effecteurs ne sont efficaces que s'ils sont produits par un nombre suffisant de bactéries (ex : production de facteurs de virulence durant l'infection, production d'enzymes de dégradation...).

Dans ce cas, le QS n'apporterait aucun avantage sélectif individuel, mais confèrerait un avantage sélectif au groupe dans son ensemble. Ce concept est cependant sur certains points mis en défaut par la théorie de l'évolution. En effet, une population risque à tout moment d'être envahie soit par des bactéries « profiteuses » qui utiliseraient les bénéfices des signaux sans en produire, soit par des bactéries capable d'interférer avec le(s) système(s) de communication.



**Figure 16 :** Quorum Sensing : la réponse concertée n'est activée que lorsque la population atteint une certaine densité. Les fonds rouge et jaune correspondent respectivement à une concentration basse et élevée en autoinducteurs. D'après Hense *et al.*, 2007.

De manière générale, tous les systèmes coopératifs posent un problème du point de vue évolutif : pourquoi un individu devrait-il s'engager dans un processus coopératif coûteux pour le bénéfice d'autres individus ou d'un groupe ? Les individus profitant de ces comportements sans y participer prendront théoriquement un avantage sélectif. Pourquoi de tels comportements sont-ils apparus au cours de l'évolution et pourquoi ont-ils été maintenus ?

Deux hypothèses majeures ont été proposées (West *et al.*, 2006): (i) Le comportement coopératif apporte un bénéfice direct au caractère reproductif de l'individu concerné, compensant ainsi le coût de la coopération, (ii) dans le cas d'une coopération altruiste (pas de bénéfice pour l'individus donneur, mais bénéfice pour l'individu receveur), le caractère coopératif ne peut être expliqué que si le donneur et le receveur partagent des gènes communs. Ainsi, l'individu altruiste assure de façon indirecte le transfert de certains de ses gènes (Loi d'Hamilton).

#### I.3.3.2 Diffusion Sensing

La concentration d'autoinducteurs dans le milieu est cependant dépendante de nombreux facteurs comme la diffusion, l'advection (déplacement de masses, par exemple de deux liquides miscibles) ou encore la production du même autoinducteur par une autre espèce bactérienne. La concentration en autoinducteur pourrait donc être utilisée afin d'estimer les facteurs pouvant affecter la concentration de ces molécules.

En 2002, Rosemary Redfield a proposé que le phénomène de QS serait en fait une mesure de la diffusion des autoinducteurs dans le milieu, elle nomme ce concept « Diffusion Sensing » (Redfield, 2002). Le Diffusion Sensing (DS) permettrait donc à une bactérie de déterminer si les molécules sécrétées diffusent rapidement autour de la cellule et de réguler en conséquence la sécrétion d'enzymes de dégradation et d'autres effecteurs afin de minimiser les pertes dues à la diffusion (Voir Figure 17). D'après ce modèle, le DS aurait été sélectionné au cours de l'évolution car il apporte un avantage sélectif aux bactéries individuelles, ce qui en fait de ce point de vue un modèle plus simple que le QS.



**Figure 17 :** Diffusion Sensing : la concentration d'autoinducteur produite par une seule cellule permet de mesurer la diffusion de ces molécules dans le milieu environnent. Un espace suffisamment confiné conduit alors à la régulation de gènes cibles. Les fonds rouge et jaune correspondent respectivement à une concentration basse et élevée en autoinducteurs. D'après Hense *et al.*, 2007.

#### I.3.3.3 Efficiency Sensing

L'organisation spatiale des bactéries peut avoir un impact très important sur la concentration environnante de molécules signal. En effet, l'environnement naturel des bactéries est souvent mixte (cohabitation avec d'autres espèces), hétérogène (présence de différentes particules) et soumis à des contraintes de transfert de masse. C'est par exemple le cas des biofilms ou de la rhizosphère. Ces contraintes ne sont pas intégralement prises en compte dans les théories de Quorum Sensing et de Diffusion Sensing.

Très récemment, un nouveau modèle, dénommé Efficiency Sensing (Voir Figure 18) a été proposé (Hense *et al.*, 2007), et permet d'unifier QS et DS. Il propose que le mode de croissance en microcolonies, adopté par de nombreuses espèces, permettrait de mettre à l'écart les bactéries

« profiteuses ». D'après cette hypothèse, l'Efficiency Sensing aurait évolué car il confère à la fois un avantage au groupe et aux individus.



**Figure 18 :** Efficiency Sensing : la concentration de l'autoinducteur, en absence de contraintes de transfert de masse, permet de mesurer le degré de regroupement des bactéries. Lorsque qu'une certaine configuration spatiale des bactéries est atteinte, les bactéries régulent en conséquence certains gènes cibles. Les fonds rouge et jaune correspondent respectivement à une concentration basse et élevée en autoinducteurs. D'après Hense *et al.*, 2007.

# I.4 Quorum Sensing chez les bactéries Gram négatives : Principes moléculaires

Comme nous l'avons vu précédemment, les systèmes de communication basés sur les molécules de type AHL nécessitent au minimum quatre éléments : une molécule signal, l'enzyme responsable de la synthèse de cette molécule, un régulateur de type LuxR reconnaissant la molécule signal et un jeu de gènes cibles contrôlés par ce régulateur ainsi que nous l'avons présenté précédemment. Nous détaillerons chacun de ces éléments dans les paragraphes suivants.

#### I.4.1 Diversité des signaux de type AHLs

Les molécules de types acyl-homosérine lactones sont composées, comme leur nom l'indique, d'un anneau homosérine lactone d'une part, et d'une chaîne acyl variable d'autre part (Figure 19). Suivant l'espèce productrice, la chaîne acyl peut varier par sa longueur (de 4 à 18 carbones), sa saturation et la présence de différentes substitutions sur le troisième carbone (groupement carbonyle C=O, ou groupement hydroxyle CH-OH). Il existe ainsi une variété d'AHLs conférant une certaine spécificité aux communications bactériennes au sein d'une population mixte (voir table 4). Cependant, un même type d'AHL peut être produit par plusieurs espèces, et un régulateur de type LuxR peut reconnaître une gamme d'AHLs.



**Figure 19 :** Structure générale des molécules de type AHL (acyl-homosérine lactone). Ces molécules diffèrent par la longueur (n) et la saturation de la chaîne acyl ainsi que par le groupement R du troisième carbone.

Le caractère amphipathique des AHLs leur confère la capacité de diffuser à travers les membranes bactériennes (Kaplan and Greenberg, 1985). Cependant les AHLs possédant une longue chaîne acyl diffusent plus difficilement à travers ces membranes. Il a notamment été mis en

Organisme	Homologues Luxl/LuxR	Autoinducteur	Fonctions régulées	Références
Vibrio fischeri	LuxI/LuxR	3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL	Bioluminescence	Callahan <i>et al.,</i> 2000
	AinS	C <sub>8</sub> -HSL	Facteurs de colonisation	Lupp <i>et al.,</i> 2003
Agrobacterium tumefaciens	Tarl/TraR	3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL	Transfert conjugatif du plasmide Ti	Piper <i>et al.,</i> 1993
Burkholderia cepacia	Cepl/CepR	C <sub>8</sub> -HSL	Production de siderophore et de protéase	Lewenza <i>et al.</i> , 1999
Erwinia	Expl/ExpR	3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL	Synthèse d'exoenzymes	Pirhonen <i>et al.,</i> 1993
carotovora	Carl/CarR	3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL	Synthèse de carbapenème	Bainton et al., 1992
Pseudomonas aeruginosa	Lasl/LasR	3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	Biofilms, synthèse d'exoprotéases	Davies <i>et al.</i> , 1998 ;
	Rhll/RhlR	C <sub>4</sub> -HSL	Synthèse de rhamnolipides	Latifi <i>et al.</i> , 1994 Pearson <i>et al.</i> , 1996 ;
Rhizobium leguminosarum	Rhil/RhiR	C <sub>6</sub> -HSL C <sub>7</sub> -HSL C <sub>8</sub> -HSL	Nodulation	Gonzales <i>et al.,</i> 2003
	Cinl/CinR	30H-C <sub>14</sub> :1-HSL	Inhibition de la croissance	Lithgow et al., 2000
Pantoea stewartii	Esal/EsaR	3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL	Production d'exopolysaccharides	Von Bodman <i>et al.,</i> 1998
Serratia liquefaciens	SwR/SwI	C <sub>4</sub> -HSL	Swarming, production de protéases	Eberl <i>et al.,</i> 1996
Rhodobacter sphaeroides	Cerl/CerR	7- <i>cis</i> -C <sub>4</sub> -HSL	Inhibition de l'agrégation bactérienne	Puskas <i>et al.,</i> 1997
Chromobacteri um violaceum	Cvil/CviR	C <sub>6</sub> -HSL	Synthèse d'antibiotiques, d'exoenzymes, de violacéine	McClean <i>et al.,</i> 1997

évidence que le transport de certaines AHLs, comme la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL produite par *P. aeruginosa*, est facilité par des pompes d'efflux (Pearson *et al.*, 1999).

Table 4 : Exemples de systèmes de Quorum Sensing basés sur la synthèse et la détéction d'AHLs.

# I.4.2 <u>Les AHL-synthases</u>

Les AHLs sont synthétisées par les AHL-synthases. Ces enzymes ont été classées en différentes familles en fonction de leurs séquences et des substrats utilisés lors de la synthèse des molécules signal. Trois types d'AHLs synthétase ont été décrites à ce jour: la famille LuxI (Parsek *et al.*, 1999), comprenant les homologues de l'enzyme LuxI découverte chez *V. fischeri*, la famille LuxM/AinS (Bassler *et al.*, 1993) et enfin l'enzyme HdtS décrite chez *Pseudomonas fluorescens* (Laue *et al.*, 2000).

Les enzymes de type LuxI sont les AHL-synthases les plus répandues puisqu'elles sont conservées dans plus de 50 espèces bactériennes (Nasser and Reverchon, 2006). Ces enzymes

utilisent la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) comme donneur de groupement amide, et une acyl-ACP (acyl carrier protein) (Hanzelka and Greenberg, 1996 ; Parsek *et al.*, 1999) comme donneur de chaîne acyl. La réaction est initiée par la liaison de la SAM et de l'acyl-ACP à l'enzyme de type LuxI (voir Figure 20).

L'enzyme catalyse la réaction d'acylation qui greffe la chaîne acyl sur la SAM. L'holo-ACP est alors relarguée et la lactonisation (formation d'un ester cyclique) de la méthionine permet de générer l'AHL (More *et al.*, 1996). L'ordre d'interaction entre l'enzyme de type LuxI et les deux substrats est cependant encore controversée (Watson *et al.*, 2002).



**Figure 20 :** A :Modèle du mécanisme de synthèse des AHLs par les enzymes de type LuxI. LuxI lie l'ACP et la Sadenosyl méthionine (SAM) puis le groupe acyl est transféré pour former une liaison amide avec la SAM. L'acyl-SAM est convertie en acyl homosérine lactone (AHL) avec le relarguage de 5'-methylthioadenosine (MTA). B : Schéma du polypeptide LuxI de *V. fischeri* . Les acides aminés 25 à 104 forment le site actif pour la formation de la liaison amide (active site). D'après Greenberg, 1997.

Les protéines de type LuxI reconnaissent seulement les ACP portant une chaîne acyl d'une certaine longueur, ce qui permet de conserver la spécificité de la communication au sein de l'espèce. Ces interactions moléculaires ont été découvertes grâce à l'étude structurale par cristallographie de EsaI, la protéine de type LuxI de *Pantoea stewartii* (Watson *et al.*, 2002). Ce travail a révélé que l'enzyme EsaI possède une cavité hydrophobe dans laquelle vient se nicher la chaîne acyl de l'acyl-ACP. Il semblerait que la taille de cette cavité conditionne la taille de la chaîne acyl porté par l'ACP et donc celle de l'AHLs synthétisée. Les particularités structurales de la cavité, variables d'une enzyme de type LuxI à l'autre, assurent donc la spécificité de la molécule signal produite.

Un autre type d'AHL-synthase, ne possédant pas d'homologie de séquence avec la famille LuxI, a été mise en évidence chez V. fischeri (Hanzelka et al., 1999). Cette enzyme, appelée AinS, est responsable de la synthèse de la C<sub>8</sub>-HSL chez cette bactérie. Un homologue de cette enzyme, LuxM, a été mis en évidence chez V. harveyi. La différence majeure entre ce type d'enzymes est la source de chaîne acyl : acyl-ACP pour la famille LuxI et acyl-CoA pour LuxM/AinS.

L'enzyme HdtS de *P. fluorescens*, constituerait selon certains groupes de recherche un autre type d'AHL-synthase, ne présentant d'homologie de séquence avec aucune des deux familles décrites ci-dessus. Elle serait responsable de la synthèse de trois types différents d'AHLs chez cette

bactérie (Laue et al., 2000). HdtS est homologue à PlsC chez E. coli, une enzyme qui catalyse le transfert d'une chaîne acyl provenant d'une acyl-ACP ou d'un acyl-CoA sur l'acide lysophosphatidique ou LPA (un composé impliqué dans la voie de biosynthèse des phospholipides membranaires). L'expression d'HdtS chez E. coli permettant la production de trois types d'AHLs, il a été proposé que HdtS pourrait transférer une chaîne acyl sur la SAM afin de générer des AHLs. Cette hypothèse est cependant encore très controversée et il semblerait que le rôle physiologique d'HdtS chez P. fluorescens soit apparenté à celui de PlsC chez E. coli. En effet, l'expression de HdtS peut complémenter un mutant plsC chez E. coli et inversément et le mutant hdtS de P. fluorescens présente une altération de la composition cellulaire en acides gras (Cullinane et al., 2005). Ces données seraient donc en faveur d'une activité LPA acyltransférase. D'autre part, il a été mis en évidence qu'un mutant plsC chez P. aeruginosa conduit à des modifications de la composition membranaire en acide gras, à la production précoce des molécules de type AHL et à une activation prématurée des gènes impliqués dans la réponse de stringence (Baysse et al., 2005), elle même liée à la régulation du système de QS de cette bactérie. Cette étude montre que le QS et la réponse de stringence, peuvent être activés de façon indépendante de leur stimuli respectifs (densité de population et carence en nutriments respectivement) via d'autres stress ressentis par la bactérie.

#### I.4.3 Les régulateurs de type LuxR

Les régulateurs transcriptionnels capables de lier les AHLs et de réguler l'expression de gènes cibles en conséquence sont tous homologues au régulateur LuxR découvert chez *V. fisheri*. Les protéines appartenant à cette famille ont une taille d'environ 250 acides aminés et présentent entre 18 et 25% d'identité de séquence. Les régulateurs de type LuxR sont composés de deux modules fonctionnels (voir Figure 21) : un domaine N-terminal de liaison aux AHLs (domaine régulateur) et un domaine C-terminal de liaison à l'ADN (domaine activateur) (Choi and Greenberg, 1991; Hanzelka and Greenberg, 1995).



**Figure 21 :** Diagramme schématique représentant le régulateur LuxR de *V. fischeri*. Ce régulateur est composé de deux modules fonctionnels, le domaine N-terminal de régulation, ou domaine de liaison aux AHLs, et le domaine C-terminal d'activation, ou domaine de liaison à l'ADN). Modifié à partir de Greenberg, 1997.

La plupart des régulateurs de type LuxR sont des activateurs transcriptionnels et induisent le recrutement de l'ARN-polymérase au promoteur cible et donc l'activation de la transcription. Dans ce modèle, la fixation des AHLs au régulateur conduit à des changements conformationnels nécessaires à la fixation du régulateur au promoteur cible (Qin *et al.*, 2000 ; Urbanowski *et al.*, 2004 ; Zhu and Winans, 2001 ; Kiratisin *et al.*, 2002). Cependant, ce modèle ne peut pas être généralisé car certains régulateurs de type LuxR agissent comme répresseur dont l'activité de liaison à l'ADN est réprimé lors de l'interaction avec des AHLs (Minogue *et al.*, 2002 ; Horng *et al.*, 2002 ; Nasser *et al.*, 1998).

La liaison d'AHLs aux régulateurs LuxR conduit à des changements conformationnels modifiant leur activité transcriptionelle. La plupart des régulateurs LuxR décrits agissent comme activateurs transcriptionnels en présence de molécules signal. Ainsi, LuxR (*V. fischeri*), TraR (*A. tumefaciens*), LasR et RhlR (*P. aeruginosa*) se lient spécifiquement à leur séquences cibles sous forme de dimères en présence de leurs molécules signal (Urbanowski *et al.*, 2004 ; Zhu and Winans, 2001 ; Schuster *et al.*, 2004b ; Lamb *et al.*, 2003). EsaR se lie également à des séquences cibles sous forme de dimère, mais en absence d'AHLs. En effet, la liaison des AHLs à ce régulateur bloque l'interaction avec le promoteur en modifiant l'état de multimérisation de EsaR (Minogue *et al.*, 2002 ; von Bodman *et al.*, 2003). D'autre part, alors que TraR et LuxR ne sont décrit que comme activateurs transcriptionnels, EsaR et CepR (le régulateur de type LuxR de *Burkholderia cenocepacia*) peuvent se comporter soit comme des activateurs soit comme des répresseurs transcriptionnels suivant la position du site de liaison dans le promoteur (Minogue *et al.*, 2002 ; von Bodman *et al.*, 2003 ; Riedel *et al.*, 2003).

Les modifications structurales engendrées par la liaison aux AHLs semblent donc variables d'un régulateur LuxR à l'autre. Cette hypothèse a été renforcée grâce à l'étude du régulateur CarR, le régulateur LuxR d'*Erwinia carotovora*. Ce régulateur forme des dimères stables capables de lier des promoteurs cibles en absence de molécules signal, et d'inhiber ainsi l'expression des gènes sous leur dépendance. La liaison des AHLs à ces dimères conduit à la formation de tétramères et à l'activation des gènes cible (Welch *et al.*, 2000).

Une analyse phylogénétique des régulateurs de type LuxR a permis d'identifier deux groupes phylogénétiquement distincts. Les régulateurs du groupe A appartiennent aux protéobactéries des divisions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  alors que les régulateurs du groupe B appartiennent à la subdivision des  $\gamma$ protéobactéries (Lerat and Moran, 2004). De façon intéressante, les protéines du groupe A sont généralement des activateurs alors que les régulateurs de type LuxR agissant comme répresseurs font plutôt partie du groupe B. C'est le cas de EsaR de *Pantoea stewartii* (Minogue *et al.*, 2002), YpsR de *Yersina pseudotuberculosis* (Atkinson *et al.*, 1999), SpnR de *Serratia marcescens* (Horng *et al.*, 2002) et ExpR et VirR de différentes espèces d'*Erwinia*. Les régulateurs des groupes A et B auraient donc évolué à partir de deux ancêtres distincts (Nasser and Reverchon, 2006).

#### I.4.3.1 Domaine de liaison aux AHLs

Les deux premiers tiers de la séquence des régulateurs de type LuxR constituent le domaine de liaison aux AHLs. Il est constitué d'une région impliquée dans la liaison de la molécule signal (résidus 79 à 127 en référence au régulateur de *V. fischeri*) et d'une région impliqué dans la multimérisation du régulateur (résidus 116 à 161, voir Figure 22) (Choi and Greenberg, 1992). Les acides aminés participant à la multimérisation de ce régulateur sont cependant peu conservés chez les autres membres de régulateurs de type LuxR (Lamb *et al.*, 2003).



**Figure 22 :** Schématisation du régulateur LuxR de *V*. *fischeri*. Le domaine N-terminal (résidus 1 à 160) est le domaine de régulation. Les résidus 79 à 127 sont impliqués dans la liaison à l'autoinducteur. Enfin, les résidus 120 à 160 sont impliqués dans la multimérisation du régulateur. Modifié à partir de Greenberg, 1997.

La première évidence que le domaine N-terminal du régulateur LuxR de *V. fischeri* est capable de lier les AHLs vient de l'observation suivante : la surexpression de ce domaine chez *E. coli* entraîne l'accumulation de molécule signal dans le cytoplasme de cette bactérie (Hanzelka and Greenberg, 1995). Deux études cristallographiques menées sur le complexe ternaire TraR/3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL/promoteur ont apporté de nombreuses informations quant aux résidus impliqués dans les interactions de LuxR avec l'AHL (Zhang *et al.*, 2002b ; Vannini *et al.*, 2002).

Les études biochimiques menées jusqu'alors ont montré que les régulateurs de type LuxR lient leur AHL spécifique dans un ratio d'une molécule signal par monomère de régulateur (Zhu and Winans, 2001 ; Schuster *et al.*, 2004b ; Welch *et al.*, 2000). Les régulateurs de type LuxR ont une très forte affinité pour les AHLs (Urbanowski *et al.*, 2004). Par exemple, le K<sub>D</sub> de TraR pour son ligand est de ~1 nM, ce qui permet au régulateur de détecter des concentrations d'AHLs proches de 1 molécule par bactérie (Zhu and Winans, 1999). Cependant des différences ont été observées quant à l'affinité des régulateurs pour leur ligand et la stabilité des complexes. Par exemple, TraR forme un complexe irréversible avec la 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL (Zhu and Winans, 2001). Il a été proposé que la fixation de la molécule signal à la chaîne naissante du polypeptide TraR est nécessaire à l'acquisition de la structure tertiaire du régulateur. Le complexe LuxR/3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL peut quant à lui être dissocié par simple dilution (Urbanowski *et al.*, 2004). Une situation intermédiaire a été observée pour le complexe LasR/3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (Schuster *et al.*, 2004b).

Le domaine N-terminal de TraR est composé de cinq brins  $\beta$  antiparallèles entourés de chaque côté par 3 hélices  $\alpha$  (voir Figure 23A). La cavité dans laquelle s'encastre l'AHL est composée d'acides aminés hydrophobes et d'acides aminés aromatiques très conservés chez les régulateurs LuxR. Le fait que l'AHL soit complètement enfouie dans la cavité hydrophobe formée par cette structure suggère que la liaison et le relarguage de cette molécule impliquent des changements drastiques.



**Figure 23 :** Organisation du domaine de liaison aux AHLs de TraR (domaine N-terminal), le régulateur LuxR d'*Agrobacterium tumefaciens*. A : les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les brins  $\beta$  en vert. B : ponts hydrogène stabilisant l'AHL au sein de la cavité hydrophobe du domaine N-terminal. Ces résidus sont très conservés au sein des régulateurs de type LuxR. Modifié de Nasser and Reverchon, 2006.

L'AHL est stabilisée dans la cavité par quatre ponts hydrogènes (voir Figure 23B). Le résidu Trp57 forme un pont hydrogène avec le groupement cétone de l'anneau lactone, le résidu Asp70 avec le groupe imine et le résidu Tyr53 avec le groupement cétone porté par le premier carbone de

la chaîne acyl. Un quatrième pont hydrogène est établi entre une molécule d'eau et et le groupement cétone du troisième carbone de la chaîne acyl. Cette liaison est stabilisée par les résidus Thr129 et Ala38.

La chaîne acyl est positionnée sur la surface du feuillet  $\beta$  et est stabilisée par différents résidus grâce à des interactions hydrophobes. Parmi ces résidus, seuls Tyr61 et Trp85 sont strictement conservés entre les régulateurs LuxR. La Phe62 est responsable de l'obstruction de la cavité à l'extrémité de la chaîne acyl, ce qui pourrait expliquer pourquoi la liaison de la 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL au régulateur TraR est irréversible. Ce résidu n'est en effet pas conservé chez les autres régulateurs du QS et est remplacé par des résidus moins encombrants (Vannini *et al.*, 2002).

Il semblerait donc que la nature de la chaîne acyl et des acides aminés composant la cavité de liaison aux AHLs joue un rôle important dans l'affinité et la spécificité du régulateur par rapport au ligand ainsi que dans la stabilité du complexe formé (Nasser and Reverchon, 2006). Cette hypothèse a été confirmée par une étude dans laquelle les acides aminés prédits comme étant impliqués dans la liaison et la sélection des AHLs ont été mutés (Chai and Winans, 2004). D'autre part, il a été montré que TraR est capable d'interagir avec différentes AHLs, mais que seule une partie de ces molécules conduit aux changements conformationnels nécessaires à l'activation de TraR, les autres étant des antagonistes de ce régulateur (Zhu *et al.*, 1998).

Des études de mutagenèse sur les régulateurs LuxR (Finney *et al.*, 2002), LasR (Kiratisin *et al.*, 2002) et RhlR (Lamb *et al.*, 2003) ont démontré que la mutation des acides aminés correspondant à ceux impliqués dans la liaison de la 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL par TraR, engendre des régulateurs incapables de répondre à la présence de leur autoinducteur. Ces résultats suggèrent que la structure globale de la cavité de liaison des AHLs est conservée au sein des régulateurs LuxR.

#### I.4.3.2 Domaine de liaison à l'ADN

Le dernier tiers de la séquence des régulateurs de type LuxR comporte un motif de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine d'activation impliqué dans des interactions avec le complexes d'initiation de la transcription (voir figure 24). Le site de liaison à l'ADN de certains régulateurs de type LuxR a été identifié. Il s'agit de séquences palindromiques d'environ 20 pb appelée « *lux box* » chez *V. fischeri* (Devine *et al.*, 1989 ; Stevens and Greenberg, 1997 ; Egland and Greenberg, 1999).



**Figure 24 :** Le domaine C-terminal de LuxR (résidus 160 à 250) contient un motif helice-tour-hélice (HTH) ainsi qu'un domaine activateur (résidus 230 à 250). Ce domaine est nécessaire à l'activation de la transcription mais pas à la liaison du régulateur à l'ADN. Modifié à partir de Greenberg, 1997.

Le motif de liaison à l'ADN (motif hélice-tour-hélice ou HTH) est homologue au domaine de liaison à l'ADN d'un groupe plus large de régulateurs transcriptionnels appelé superfamille LuxR (cette famille inclut par exemple des régulateurs appartenant à des systèmes deux composants et des régulateurs du QS, voir figure 25).



**Figure 25:** Diagramme schématique du régulateur LuxR de *V. fischeri* et d'autres régulateurs appartenant à la superfamille LuxR. Le schéma du haut représente les deux modules fonctionnels de LuxR (le domaine de régulation capable de lier les AHLs et le domaine d'activation capable de lier l'ADN). LasR et TraR sont également des régulateurs du QS chez *P. aeruginosa* et *A. tumefaciens* respectivement. FixJ (*Rhizobium meliloti*) et NarL (*E. coli*) sont des régulateurs de réponse de systèmes deux composants. GerE de *Bacillus subtilis* ne comporte pas de domaine de régulateurs comprend également la région 4 (le domaine de liaison à la séquence -35) du facteur sigma 70 et d'autres facteurs  $\sigma$ . D'après Fuqua *et al.*, 1994.

La purification du régulateur LuxR et de certains de ses homologues s'est avérée être une tâche délicate. De fait ces protéines sont associées au feuillet cytoplasmique de la membrane interne (Kolibachuk and Greenberg, 1993) et GroESL est nécessaire pour le repliement correct de ces protéines (Dolan and Greenberg, 1992 ; Adar *et al.*, 1992). Ces difficultés ont été contournées chez *V. fischeri* grâce à la délétion du domaine N-terminal du régulateur LuxR (LuxR $\Delta$ N). Cette protéine purifiée à permis de réaliser les premières études *in vitro* d'interaction entre le régulateur et ses promoteurs cibles (Stevens *et al.*, 1994 ; Stevens and Greenberg, 1997).

LuxRAN est un régulateur constitutivement actif, il active le promoteur de l'opéron *luxCDABE* indépendamment des AHLs (Choi and Greenberg, 1991) et ce de façon plus forte que le régulateur complet. LuxRAN est monomérique car le domaine de multimérisation, présent dans le domaine N-terminal, est absent de ce polypeptide (Choi and Greenberg, 1992; Stevens *et al.*, 1994). Les auteurs ont suggéré que le domaine N-terminal de LuxR permettrait en absence d'AHLs de masquer le domaine d'interaction à l'ADN et que cette inhibition serait levée en présence de molécules signal. Ce type de comportement a également été suggéré lors de la construction de FixJAN, un régulateur deux composants appartenant à la famille LuxR (Da Re *et al.*, 1994).

Ces observations confortent le mécanisme général d'activation des régulateurs membres de la superfamille LuxR: le domaine N-terminal de cette famille de régulateur agirait négativement afin d'empêcher la liaison du domaine C-terminal avec l'ADN cible (Da Re *et al.*, 1994). Cette inhibition serait levée en présence d'un ligand spécifique (AHL dans le cas des régulateurs de type LuxR et groupement phosphoryl dans les cas des régulateurs deux composants).

De nombreuses études de mutagenèse ont été réalisées sur les gènes codant pour les régulateurs LuxR et TraR. Parmi elles, deux études ont montré que certaines mutations ne gênaient pas la liaison de LuxR au promoteur cible, mais conduisaient à une abolition de l'activation de la transcription. Ces études ont permis de délimiter une région (résidus 230 à 250, voir figure 24) impliquée dans les interactions que forme LuxR avec le domaine C-terminal de la sous unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase ( $\alpha$ -CTD), (Egland and Greenberg, 2001 ; Choi and Greenberg, 1992). En effet, l'activation de l'opéron *lux* par LuxR $\Delta$ N nécessite le domaine  $\alpha$ -CTD de l'ARN polymérase (Stevens *et al.*, 1999). Il a été proposé que cette interaction compense la faible affinité que pourrait avoir LuxR $\Delta$ N pour la *lux box*. Les régulateurs TraR et ExpR purifiés (régulateurs transcriptionnels

d'*A. tumefaciens* et d'*Erwinia carotovora* respectivement) sont quant à eux capables de lier leurs promoteurs cibles en absence d'ARN-polymérase.

Le régulateur LuxR de V. fischeri active le gène luxI en se fixant sur une séquence palindromique de 20 pb. Cette séquence, appelée lux box est centrée à la position -42,5 par rapport au site +1 de la transcription (Devine *et al.*, 1989 ; Stevens and Greenberg, 1997 ; Egland and Greenberg, 1999). Les deux demi-sites formant le palindrome de la *lux box* sont nécessaires à l'activité de LuxR et LuxR $\Delta$ N. Il a été proposé que l'activité de LuxR impliquerait des contacts à la fois en amont et en aval de la *lux box*. LuxR serait donc un activateur ambidextre (Rhodius and Busby, 1998). Cependant, ce modèle est encore assez controversé (Whitehead *et al.*, 2001 ; Luo and Farrand, 1999) et pourrait ne pas être généralisable à tous les régulateurs de type LuxR. De même, certains activateurs de type LuxR nécessitent la liaison aux AHLs afin de pouvoir se lier aux séquences cibles, alors que d'autres ont besoin de cette interaction pour activer les gènes cibles, mais pas pour se lier aux séquences cibles (Medina *et al.*, 2003). L'ensemble de ces observations suggère que chaque régulateur de type LuxR pourrait agir suivant un mécanisme qui lui est propre.

Des sites palindromiques similaires ont été mis en évidence devant les gènes cibles régulés par le QS chez différentes espèces bactériennes (voir figure 26). Ces sites de reconnaissance présentent cependant une certaine variabilité. Par exemple, les sites de liaison à l'ADN de QscR et de LasR possèdent 15 bases communes sur 20, cependant ils ne sont pas interchangeables (Lee *et al.*, 2006).



**Figure 26** : Comparaison de séquences entre les différentes boîtes de fixation de régulateurs de type LuxR. Lux = *lux box* de *Vibrio fischeri* (Devine *et al.*, 1989), Rhl = *rhl box* et Las = *las box* de *Pseudomonas aeruginosa* (Latifi *et al.*, 1995), Sol = *sol box* de *Ralstonia solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997b), Cep = *cep box* de *Burkholderia cepacia* (Lewenza *et al.*, 1999), Afe: *lux box* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rivas *et al.*, 2005). Con = séquence consensus séquence dérivée de l'alignement de ces 6 « lux box ».

Il est important de préciser que tous les gènes cibles du QS ne possèdent pas nécessairement de boîte conservée au sein de leur promoteur. Par exemple, une étude transcriptomique a montré que la *las box* (équivalent de la *lux box* chez *P. aeruginosa*) n'est retrouvée que pour 7% des promoteurs régulés par LasR (Wagner *et al.*, 2003). Ce pourcentage faible peut être expliqué soit par une régulation indirecte des gènes ne possédant pas la *las box*, soit par une faible conservation de cette séquence au sein des promoteurs cibles.

#### I.4.3.3 Régulons dépendants du Quorum Sensing

Le développement des techniques de DNA microarrays et de protéomique a permis de mettre en évidence que les systèmes de QS contrôlent l'expression des gènes de nombreuses bactéries de manière globale. Le système de QS de *Streptoccocus pneumoniae* régule 150 gènes impliqués dans de nombreux phénotypes (compétence, formation de biofilms, virulence...), (Waters and Bassler, 2005). Chez *P. aeruginosa*, près de 10 % du génome se trouve sous le contrôle direct ou indirect du QS (Wagner *et al.*, 2003 ; Schuster *et al.*, 2003). Ces expériences ont également démontré pour la première fois que certains gènes sont réprimés par le système de QS de cette dernière. Enfin, l'ensemble des gènes de virulence décrits (plus de 70 gènes) de *Vibrio cholerae* est sous le contrôle du QS (Zhu *et al.*, 2002). Ces études suggèrent que les systèmes de QS permettent aux bactéries d'alterner entre différents programmes génétiques afin de s'adapter à différentes conditions environnementales. De plus, puisque certains gènes sont réprimés en présence de molécules signal, ce système pourrait être utilisé afin de finaliser des processus qui ne sont bénéfiques aux bactéries que lorsqu'elles sont en faible densité de population (Waters and Bassler, 2005).

# I.5 Le Quorum Sensing, un système parfois complexe...

#### 1.5.1 Intégration du QS dans d'autres réseaux de régulation : le cas de P.aeruginosa

La production de molécules signal est régulée chez de nombreuses espèces bactériennes. Par exemple, l'expression de l'AHL-synthase LuxI de *V. fischeri* est activée positivement en présence d'AHLs, créant ainsi une boucle de régulation positive. Ce phénomène est observé chez plusieurs espèces (Hao *et al.*, 2006, Pestova *et al.* 1996). Les gènes homologues à *luxI/luxR* de *V. fischeri* sont d'ailleurs souvent localisés à proximité. De plus, certaines espèces bactériennes possèdent plusieurs systèmes de production et/ou d'intégration de signaux de communication. Ces systèmes peuvent être parallèles comme chez *V. harveyi* (paragraphe I.3.2.2) ou hiérarchisés comme nous le verrons ci-après chez *P. aeruginosa*.

De nombreux signaux extérieurs aux signaux de QS peuvent contrôler la production de molécules signal, englobant ainsi ce système de communication dans un réseau global de régulation (voir Figure 27). En englobant le système de QS dans un tel réseau de régulation, les bactéries sont capables de moduler la production de molécules signal de sorte que leur concentration ne reflète pas uniquement la densité de population, mais également des paramètres environnementaux spécifiques.



**Figure 27 :** Modèle d'intégration de différents signaux (autoinducteurs, signaux environnementaux...) par une bactérie. L'intégration de ces signaux participe à l'adaptation à des changements environnementaux grâce à des systèmes de régulation organisées en parallèle ou en cascade. D'après Withers *et al.*, 2001.

Le système de QS de *P. aeruginosa* a été très étudié et constitue un bon exemple d'intégration d'un système de communication au sein d'un système de régulation global. Le système de communication de *P. aeruginosa* est basé sur deux synthases homologues à LuxI de *V. fischeri* : LasI et RhII responsables de la synthèse de 3-oxo- $C_{12}$ -HSL et de  $C_4$ -HSL respectivement. Ces molécules signal sont reconnues par les régulateurs LasR et RhIR, homologues à LuxR de *V. fischeri*. LasR active la production des quinolones (HHQ et PQS) de *Pseudomonas*, ce qui constitue également un niveau de régulation supplémentaire puisque leur synthèse dépend du système *las* et qu'elles induisent la transcription de *rhII*, il a donc été proposé que ces molécules constitueraient un lien entre ces deux systèmes de QS (Déziel *et al.*, 2004, Diggle *et al.*, 2006a).

De nombreux régulateurs influencent le système de QS de *P. aeruginosa*, faisant de lui un système de régulation très complexe (voir Figure 28). Les acteurs de ce système sont les suivants :

➢ Deux autres régulateurs de type LuxR (QscR et VqsR) ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa*, mais aucune AHL-synthase ne leur a été associée (Chugani *et al.*, 2001) ; (Juhas *et al.*, 2004). QscR inhibe RhlR et LasR en formant avec eux des hétérodimères inactifs en faible concentration d'AHLs. Lorsque la concentration en AHLs augmente, l'interaction des AHLs avec QscR induit la dissociation des hétérodimères et conduit à l'activation de la cascade de régulation dépendante de LasR et RhlR (Ledgham *et al.*, 2003). D'autre part, une étude transcriptomique a démontré que la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL produite par LasI sert de molécule signal a ce régulateur et que ce dernier régule plus de 400 gènes. Le régulon QscR est comoprte des gènes régulés par les systèmes *las* et *rhl* mais également un nombre important de cibles lui étant propres, démontrant un rôle spécifique de ce régulateur dans le système de QS de *P. aeruginosa* (Lequette *et al.*, 2006).

 $\blacktriangleright$  La mutation du gène vqsR (virulence and Quorum Sensing Regulator) entraîne une diminution de l'expression de *lasI* et un défaut de production d'AHLs (Juhas *et al.*, 2004). Une étude transcriptomique a révélé qu'une grande proportion (183 gènes) de gènes régulés par le QS chez *P. aeruginosa* sont également régulés par VqsR (Juhas *et al.*, 2005).

➢ Le système à deux composants GacA/GacS active la transcription des gènes codant pour les régulateurs LasR et RhlR (Reimmann *et al.*, 1997), le signal perçu par GacS n'a cependant pas encore été identifié.

E facteur sigma alternatif RpoS ( $\sigma$ S) est un régulateur central de la réponse au stress et de l'entrée en phase stationnaire. Le niveau d'expression de *rpoS* augmente considérablement lorsque les bactéries sont en haute densité de population et entrent en phase stationnaire. Cette observation a poussé plusieurs équipes à rechercher des liens entre ce régulateur et le QS. Les premières études réalisées aboutissaient à des conclusions contradictoires, la première proposait que le système *rhl* serait responsable de l'activation de la transcription de *rpoS* (Latifi *et al.*, 1996), alors que la seconde montrait que le facteur  $\sigma$ S régule négativement le QS en réprimant l'expression de *rhlI* (Whiteley *et al.*, 2000). Une troisième étude démontra grâce à l'analyse transcriptomique du régulon  $\sigma$ S que 40% du régulon QS (déterminé également grâce à une étude transcriptomique) sont aussi régulés par ce facteur  $\sigma$ S, démontrant ainsi un lien important entre les deux régulons chez *P. aeruginosa* (Schuster *et al.*, 2004a). Un autre facteur sigma alternatif, RpoN ( $\sigma$ 54), régule l'expression des gènes *rhlRI* et *lasRI* en fonction de la richesse du milieu de culture (répression en milieu riche, activation en milieu minimum), (Heurlier *et al.*, 2003 ; Thompson *et al.*, 2003).

> Des études récentes ont montré que de nombreuses régulations posttranscriptionnelles médiées par de petits ARNs non codants (sRNA), interviennent dans la régulation des systèmes de QS de V. cholerae, P. aeruginosa, E. carotovora, S. aureus (Hammer and Bassler, 2007; Bejerano-Sagie and Xavier, 2007; Kay, 2006, voir paragraphe suivant).



**Figure 28 :** Régulation des systèmes de QS hiérarchisés Rhl (RhII/RhIR) et Las (LasI/LasR) de *P. aeruginosa.* Le système Las est en amont de la hiérarchie, activant le système Rhl et la production de quinolones (PQS). Les flèches au niveau des promoteurs indiquent une régulation positive alors que les barres perpendiculaires indiquent une régulation négative. PprB est un régulateur de réponse de systèmes à deux composants activant l'expression de *lasI* et *rhIRI*. Le régulateur MvaT empêche une activation précoce du QS. Vfr est un homologue du régulateur CRP (cAMP receptor Protein) d'*E. coli.* Un mutant de ce régulateur montre un taux d'expression de *lasR* considérablement réduit, suggérant qu'il pourrait jouer un rôle capital dans l'initiation de la cascade de QS. D'après Venturi, 2006.

#### I.5.2 <u>sRNA et Quorum Sensing</u>

#### I.5.2.1 Principe de fonctionnement des sRNA

Ces dernières années, la découverte des petits ARNs non codants (sRNA) chez les organismes eucaryotes, aussi connus sous le nom de petits ARN interférant (siRNA), a fait sensation. Ils se sont avérés être impliqués dans de nombreux processus centraux, tels le développement ou la mort cellulaire. Cependant, ces ARNs régulateurs ne sont pas spécifiques aux cellules eucaryotes (Gottesman, 2005). Plusieurs études ont démontré leur importance chez les bactéries, notamment dans la régulation de la virulence et l'adaptation aux conditions de stress (Romby *et al.*, 2006).

Les sRNA ont des structures et des tailles très variées. Deux mécanismes d'action ont été particulièrement étudiés : (i) régulation directe par fixation à l'ARNm cible ou stratégie anti-sens, (ii) régulation indirecte par séquestration de protéines régulatrices. Ces deux stratégies sont brièvement décrites dans les paragraphes suivants.

La plupart des sRNA agissent par hybridation aux ARNm. Comme le montre la figure 29A, suivant la région de l'ARNm ciblée, les sRNA peuvent soit inhiber le traduction de l'ARNm (fixation sur le site de liaison au ribosome : RBS), soit activer la traduction en déstabilisant une structure secondaire de l'ARNm. Ils peuvent également modifier la stabilité des ARNm, mais ce type de mécanisme est moins bien décrit (Romby *et al.*, 2006).

De nombreux sRNA formant un nombre limité d'appariements avec les ARNm cibles nécessitent la présence de la protéine hexamerique Hfq. Cette protéine peut agir de différentes façons : soit en stabilisant le sRNA, soit en facilitant l'appariement entre mRNA et sRNA, en servant d'adaptateur (voir figure 29B).

La mutation du gène *hfq* entraîne un phénotype avirulent chez de nombreuses bactéries pathogènes telles *Listeria monocytogenes* (Christiansen *et al.*, 2004), *V. cholerae* (Ding *et al.*, 2004), *P. aeruginosa* (Sonnleitner *et al.*, 2003) ou *Brucella abortus* (Robertson and Roop, 1999). Cette observation est en accord avec le fait que de nombreux sRNA ciblent des mRNA codant pour des facteurs de virulence et des protéines impliquées dans l'adaptation aux conditions de stress. Les promoteurs des sRNA ne sont pas différents de ceux des autres gènes procaryotiques. Leur expression est cependant hautement régulée et ils sont souvent exprimés comme composants de systèmes de régulation de réponse aux stress (Gottesman, 2005 ; Storz *et al.*, 2004 ; Altuvia *et al.*, 1997).



**Figure 29 :** A : Schéma représentant les conséquences de l'hybridation des sRNA (en rouge) à leurs ARNm cibles (en bleu). B : Mécanismes par lesquels Hfq facilite les appariements sRNA-ARNm. La fixation de Hfq au sRNA (en rouge) peut conduire à la déstabilisation de structures secondaires permettant alors au sRNA de s'hybrider à sa cible. Hfq peut également faciliter la formation d'hybrides en agissant comme chaperone. D'après Storz *et al.*, 2004.

La majorité des sRNA régulent leurs cibles grâce à la stratégie anti-sens. Cependant, la découverte du sRNA CsrB chez *E. coli* a permis de mettre en évidence un autre mode d'action des petits ARN régulateurs. CsrB séquestre la protéine régulatrice CsrA (Liu *et al.*, 1997). CsrA est une

protéine dimérique qui régule ses gènes cibles post-transcriptionnellement en se fixant sur le RBS, bloquant ainsi l'accès au ribosome.

Le sRNA CsrB contient plusieurs sites de liaison à CsrA (structures en épingle a cheveux mimant le RBS) et agit comme antagoniste de ce régulateur en séquestrant plusieurs dimères de CsrA (Babitzke and Romeo, 2007, voir Figure 30). Il a été montré que CsrB est conservé chez de nombreuses bactéries et fait partie de nombreux systèmes de régulation globaux contrôlant le métabolisme, la mobilité, la formation de biofilm ou bien encore le QS. Un point commun entre tous ces homologues est que leur expression est activée par le système à deux composants GacA/GacS (Babitzke and Romeo, 2007).



**Figure 30 :** Régulation par séquestration d'une protéine régulatrice. Les protéines de la famille CsrA sont des régulateurs traductionnels se liant au RBS d'ARNm cibles. Les sRNA homologues à CsrB (en bleu) possèdent plusieurs structures en épingle a cheveux mimant les régions RBS reconnues par CsrA. Ces sRNA bloquent CsrA par séquestration. D'après Toledo-Arana *et al.*, 2007.

#### I.5.2.2 Implication des sRNA dans la régulation des systèmes de QS

Chez les bactéries pathogènes, la régulation de facteurs de virulence est souvent sous dépendance du QS. Les sRNA sont des effecteurs centraux des systèmes de QS de plusieurs pathogènes (*V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*...), (Hammer and Bassler, 2007 ; Venturi, 2006 , Novick, 2003). Cette régulation via les sRNA permet une réponse plus efficace car la synthèse et la dégradation d'ARNs sont plus rapides que la synthèse et la dégradation de protéines. D'autre part, la plupart des systèmes de QS utilisant ce type de régulation possèdent plusieurs sRNA redondants. Ces sRNA pourraient être régulés par différents signaux environnementaux, permettant ainsi une plus grande plasticité des circuits de régulation QS-dépendants.

Comme nous l'avons vu précédemment, le système à deux composants GacA/GacS est impliqué dans la cascade de régulation QS-dépendants chez *P. aeruginosa* (paragraphe I.5). Le régulateur de réponse GacA active l'expression de gènes codant pour l'activation de deux sRNA de type CsrB (voir paragraphe précédent) nommés RsmY et RsmZ (Bejerano-Sagie and Xavier, 2007). RsmY est RsmZ interagissent avec RsmA, une protéine régulatrice homologue à CsrA et répriment son activité. Chez *P. aeruginosa*, RsmA inhibe la traduction de l'AHL-synthase RhII, inhibant ainsi tous les gènes contrôlés par les C<sub>4</sub>-HSL produites par cette enzyme. RsmA se fixe également à l'ARNm de certains gènes régulés par le QS, ajoutant ainsi un niveau de régulation post-transcriptionnel au système de régulation QS-dépendants. D'autre part, RsmA régule positivement la production du système de sécrétion de type III qui n'est pas une cible du QS (voir figure 31).



**Figure 31 :** Le système de QS de *P. aeruginosa* est organisé en série et comporte des niveaux de régulation posttranscriptionnels médiés par le système à deux composants GacA/GacS. GacA active l'expression des sRNA RsmY et RsmZ. Ces sRNA séquestrent la protéine régulatrice RsmA, répresseur du système RhII/RhIR. RsmY est stabilisé par la protéine Hfq. D'autre part, l'expression de GacA est régulée par deux autres systèmes deux composants (LadS et RetS) dont les signaux inducteurs sont inconnus à ce jour. Les flèches représentent des régulation positives et les traits perpendiculaires indiquent des régulations négatives. D'après Bejerano-Sagie and Xavier, 2007.

Chez V. cholerae, la détection de deux types de molécules signal s'effectue grâce à des senseurs membranaires spécifiques de façon similaire à ce qui a été décrit pour V. harveyi. Ce système de régulation est régulé post-transcriptionnellement par sept sRNA : 3 homologues de CsrB (CsrB, C et D) et 4 Qrr (Quorum regulatory RNA : Qrr1-4). L'expression de CsrB, C et D est activée par le système à deux composants VarA/VarS (homologue de GacA/GacS) et conduit à l'inhibition de CsrA de façon identique à ce qui a été décrit pour *P. aeruginosa*. L'expression de Qrr1-4 est activée par LuxO~P en (absence de molécules signal).



**Figure 32 :** Le système de QS de *V. cholerae* est régulés par sept sRNA. Le système à deux composants VarA/VarS, homologue de GacA/GacS, active l'expression des sRNA Csr B, C et D qui conduisent à l'inactivation de CsrA. En abscence de molécules signal du QS, LuxO~P active l'expression de quatre sRNA (Qrr1-4) réprimant la traduction de *hapR* qui code pour un régulateur transcriptionnel impliqué dans la répression de gènes impliqués dans la virulence et la formation de biofilm. D'après Bejerano-Sagie and Xavier, 2007.

Qrr1-4 interagissent avec l'ARNm du régulateur transcriptionnel HapR contrôlant négativement des gènes impliqués dans la virulence et la formation de biofilm. A haute densité de population, la détection de signaux de type AI-1 et/ou AI-2 conduit à l'inactivation de LuxO. Les Qrr 1-4 ne sont plus exprimés et le régulateur HapR est produit (voir figure 32), (Bejerano-Sagie and Xavier, 2007). Le fait que les gènes de virulence et de formation de biofilms soient réprimés à haute densité de population semble contre intuitif puisque généralement, ces gènes sont régulés positivement dans ces conditions afin de faire face aux systèmes de défense de l'hôte. Il a été proposé que la répression de ces gènes à haute densité de population faciliterait la dissémination de *V. cholerae* dans l'environnement (Waters and Bassler, 2005).

#### 1.5.3 Le Quorum Quenching, ou comment « brouiller » les voies de communications

Les systèmes de QS de nombreuses bactéries occupent une place centrale dans la régulation de facteurs de virulence et autres gènes permettant l'adaptation à divers environnements. Le QS est donc une cible de choix pour les bactéries compétitrices et les organismes hôtes. Les stratégies visant à interférer avec ces systèmes de communication sont regroupées sous le terme «Quorum Quenching ». Plusieurs systèmes sont capables d'interférer avec les systèmes de QS. Nous distinguerons ici les systèmes d'interférence (basés sur la production d'analogues d'autoinducteurs), et les systèmes de dégradation enzymatique des molécules signal.

#### I.5.3.1 Mécanismes d'interférence

La première description d'un système de Quorum Quenching (QQ) vient de l'étude de l'algue rouge marine *Delisea pulchra*. Cet organisme sécrète des furanones halogénées capables de mimer les AHLs et donc d'interférer avec les systèmes de régulation dépendants du QS des bactéries pouvant lui être néfastes (Givskov *et al.*, 1996). Ces furanones déstabilisent les régulateurs de type LuxR, réduisant ainsi le pool de régulateurs dans les bactéries (Manefield *et al.*, 1999). De même, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardii* et les racines de certaines plantes (riz, soja, tomate...) produisent également des composés affectant les systèmes de QS bactériens (Gao *et al.*, 2003 ; Teplitski *et al.*, 2000).

La recherche d'inhibiteurs de QS parmi une librairie de molécules naturelles et synthétiques a également permis de mettre en évidence de nombreux Quorum Quencher (dans des extraits d'ail par exemple), (Rasmussen *et al.*, 2005). Certaines espèces Gram négatives, telle *P. aeruginosa*, sont capables de produire des molécules antagonistes appelées dikétopipérazines (DKPs). Ces molécules modulent l'activité des régulateurs de type LuxR en agissant comme inhibiteurs compétitifs des AHLs (Holden *et al.*, 1999), leur rôle reste cependant à déterminer.

Il est donc clair que des antagonistes de QS ont évolué dans un grand nombre d'hôtes interagissant avec des bactéries. Cette observation suggère que ce type de communication bactérienne existe depuis suffisamment longtemps pour que les cellules hôtes aient mis au point des stratégies d'interférence.

Contre toute attente, certains de ces composés activent les systèmes de QS bactériens, deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette observation : (i) l'activation prématurée de facteurs de virulence bactériens dépendants du QS, permettant ainsi d'alerter les défenses de l'hôte avant que les bactéries soient en nombre trop important, (ii) l'activation du système de QS de certaines bactéries permettrait d'initier ou de renforcer certaines interactions symbiotiques.

#### I.5.3.2 Dégradation des signaux de communication

Certaines espèces bactériennes produisent des enzymes capables de dégrader les signaux de type AHLs. Ces enzymes peuvent être classées en deux familles : les AHL-acylases et les AHLs lactonases (voir Figure 33). La première classe d'enzyme est responsable du clivage de la liaison amide liant la chaîne acyl à l'anneau lactone alors que la seconde catalyse le clivage du lien ester de l'anneau lactone (Dong *et al.*, 2000).



Figure 33 : Mécanisme de dégradation des AHLs par les AHL-acylases et les AHL-lactonases. D'après Dong and Zhang, 2005.

Certaines espèces de *Bacillus* produisent une AHL-lactonase (AiiA) qui interfère avec le système de QS de bactéries environnementales compétitrices (Dong *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2002). *Bacillus spp.* ne produit pas d'AHLs mais communique grâce à des oligopeptides, cette espèce ne dégrade donc que les molécules signal des espèces compétitives Gram négatives. Cette enzyme cible l'anneau lactone des AHLs et ne présente donc pas de spécificité par rapport à la chaîne acyl.

Ce type d'enzyme est conservé chez plusieurs espèces bactériennes (voir Table 4), dont certaines utilisent les signaux de type AHL pour communiquer. Ainsi, le gène *attM* d'*A*. *tumefaciens* code pour une AHL-lactonase homologue à AiiA. AttM dégrade les 3-oxo-C8-HSL produites par *Agrobacterium*, ce qui permettrait à cette bactérie d'utiliser ce système de dégradation afin de stopper le transfert conjugatif du plasmide Ti sous dépendance du QS (voir paragraphe I.3.2.1.2).

Un autre type d'enzyme, appelé AHL-acylase a été mis en évidence chez *Ralstonia* spp. (Lin *et al.*, 2003) ainsi que chez d'autres espèces bactériennes (Table 4), dont *Variovorax paradoxus*. Cette enzyme permet à cet organisme de dégrader les AHLs et de les utiliser comme seule source de carbone et d'azote (Leadbetter and Greenberg, 2000).

Contrairement aux AHL-lactonases, certaines de ces enzymes ne sont capables de dégrader qu'un type particulier d'AHLs. Par exemple, PvdQ et QuiP, les deux AHL-acylases produites par *P. aeruginosa*, sont capables de dégrader la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL mais pas la  $C_4$ -HSL, toutes deux synthétisées par la bactérie (Huang *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2006). Il a donc été proposé que ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la concentration d'AHLs dans certaines conditions environnementales (Sio *et al.*, 2006). D'autre part, il a récemment été démontré qu'une activité de dégradation des AHLs est associée avec la membrane de certaines cellules de mammifère et retrouvée dans le sérum de nombreux mammifères (Yang *et al.*, 2005). Cette activité de dégradation (AHL-lactonase) est associée aux paraoxonases codées par les gènes *PON*s, présentant de nombreuses autres activités de dégradation. De telles données suggèrent que les cellules de l'hôte pourraient contrer le système de QS de bactéries pathogènes durant une infection (Chun *et al.*, 2004 ; Ozer *et al.*, 2005).

EspèceGèneEnzymeRéférenceProkaryotesBacillus sp. 240B1aiiAAHL lactonase (Dong et al., 2000)
ProkaryotesBacillus sp. 240B1aiiAAHL lactonase (Dong et al., 2000)
Bacillus sp. 240B1 aiiA AHL lactonase (Dong et al., 2000)
B. thuringiensis aiiA homologue AHL lactonase (Dong et al., 2002), (Lee et al., 2002)
B. cereus aiiA homologue AHL lactonase (Dong et al., 2002), (Reimmann et al., 200
<i>B. mycoides</i> aiiA homologue AHL lactonase (Dong et al., 2002)
B. anthracis aiiA homologue AHL lactonase (Ulrich, 2004)
A. tumefaciens attM, aiiB AHL lactonase (Zhang et al., 2002a), (Carlier et al., 2003)
Arthrobacter sp. IBN110 ahlD AHL lactonase (Park et al., 2003)
Klebsiella pneumoniae ahlK AHL lactonase (Park et al., 2003)
Variovorax paradoxus VAI-C ND AHL acylase (Leadbetter and Greenberg, 2000)
Ralstonia strain XJ12B aiiD AHL acylase (Lin et al., 2003)
P. aeruginosa PAO1 PvdQ AHL acylase (Huang et al., 2003)
<i>QuiP</i> AHL acylase (Huang et al., 2006)
Eucaryotes
Humain (epithélium respiratoire) PONs Lactonase (Chun et al., 2004)
Porc (reins)ACY1Acylase I(Xu et al., 2003)

Table 4: Enzymes dégradant les AHLs chez les procaryotes et les eucaryotes. ND : Non déterminé.

Certaines bactéries sont capables d'interférer avec les systèmes de communication de type 2 utilisés par d'autres espèces bactériennes. Par exemple, l'espèce *E. coli*, bien qu'elle produise des molécules de type AI-2 ne les détecte pas grâce à un senseur membranaire, mais les importe. Cette espèce peut interférer avec le système de communication d'autres bactéries par deux stratégies indépendantes. Il a été montré d'une part que lorsque *E. coli* produit des AI-2, les espèces proches initient des comportements contrôlés par leur système de QS en réponse à l'accroissement de la population. D'autre part, la consommation d'AI-2 par *E. coli* conduit les espèces environnantes à sous estimer la densité de la population. Ces dernières ne déclenchent pas ou ne poursuivent pas correctement leur cascade de régulation QS-dépendante, ce qui peut constituer un avantage sélectif pour *E. coli* (Xavier and Bassler, 2005).

#### 1.5.4 <u>Réponse des cellules eucaryotes à la présence de signaux QS bactériens</u>

Les cellules eucaryotes ne sont pas seulement capables de produire des molécules mimant les AHLs ou de détruire des AHLs (voir paragraphe précédent), mais elles sont également capables de répondre à ce type de signaux. La première démonstration de cette compétence a été faite par Emily DiMango qui étudia l'impact des molécules signal produites par *P. aeruginosa* sur les cellules de l'hôte (DiMango *et al.*, 1995). *P. aeruginosa* est un organisme opportuniste provoquant une grande variété de maladies aigues et chroniques. Plus particulièrement, c'est une cause majeure de dégâts pulmonaires et de décès chez les patients atteints de mucoviscidose.

Cette première étude démontra qu'en présence de la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL produite par *P*. *aeruginosa*, les cellules épithéliales respiratoires produisent de l'interleukine 8 (IL-8), une cytokine connue pour son effet attractant sur les neutrophiles (DiMango *et al.*, 1995). Depuis, de nombreux effets immunomodulateurs, comme l'inhibition de la production d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  (Telford *et al.*, 1998) ou l'induction de l'apoptose (Tateda *et al.*, 2003), ont été attribués à cette molécule signal. Les mécanismes de régulation conduisant à ces phénotypes sont encore mal connus, mais il a été démontré que la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL est capable de pénétrer dans les cellules eucaryotes (Williams *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données a permis de proposer le modèle suivant (voir figure 34): la production d'autoinducteurs par *P. aeruginosa* conduit à la production d'IL-8 qui déclenche la migration au site d'infection de nombreux neutrophiles. Ces cellules immunitaires vont alors produire de nombreuses substances toxiques pour les bactéries. Ces molécules, ainsi que les facteurs de virulence produits par *Pseudomonas*, vont conduire à la destruction du tissu infecté. À cause de leur courte durée de vie, les neutrophiles entrent en apoptose et ce processus est accéléré par les 3-oxo- $C_{12}$ -HSL. Les débris résultants ainsi que le mucus surproduit par les patients atteints de mucoviscidose pourraient alors constituer une source de nutriments, et offrir une niche de survie pour *P. aeruginosa* (Tateda *et al.*, 2003).



**Figure 34 :** Modèle d'action des 3-oxo- $C_{12}$ -HSL produites par *P. aeruginosa* sur les cellules épithéliales respiratoires. *P. aeruginosa* forme un biofilm à la surface des cellules épithéliales pulmonaires. La 3-oxo- $C_{12}$ -HSL est produite par les bactéries du biofilm, créant de hautes concentrations locales en cette AHL. Les AHLs entrent dans les cellules épithéliales et activent la production d'IL-8, initiant une réponse inflammatoire locale. Les cellules épithéliales à proximité du biofilm sont détruites à cause de la réponse inflammatoire. La grande quantité d'AHLs produites par *Pseudomonas* active la réponse apoptotique des neutrophiles. Les dommages créés faciliteraient la dissémination de la bactérie et les débris libérés seraient utilisés comme source de nutriments. D'après Shiner *et al.*, 2005.

La première étude globale de l'action des signaux du QS sur les cellules eucaryotes a été réalisée sur la plante *Medicago truncatula*. Cette étude a révélé que la mise en présence des racines de cette plante avec une concentration physiologique en AHLs (1-100 nM) conduit à la variation de l'expression de plus de 100 protéines présentes dans les racines. Les AHLs affectent de nombreuses fonctions chez la plante (défense, réponse au stress, réponse aux phytohormones...). De façon intéressante, la réponse de la plante varie suivant la provenance des AHLs (bactérie pathogène ou symbiotique) (Mathesius *et al.*, 2003).

### I.6 Brucella et la brucellose

Les bactéries du genre *Brucella* sont des organismes à Gram négatif intracellulaires responsable d'une zoonose appelée brucellose. La brucellose est une maladie ancienne puisque les premières descriptions de symptômes s'apparentant à cette maladie remontent à l'époque d'Hippocrate. Des organismes comparables à *Brucella* ont d'ailleurs été détectés dans un fromage carbonisé provenant de la ville Herculaneum. Cette ville, tout comme Pompeï, a été ensevelie suite à l'éruption du mont Vésuve en 79 après J-C. Une étude a révélé que 17.4% des corps préservés par les cendres présentent des lésions osseuses typiques de la brucellose (Capasso, 2002). Cette forte

incidence serait liée à la consommation de produits laitiers contaminés. Ces observations suggèrent donc qu'animaux, humains et *Brucella spp*. cohabitent depuis de très nombreuses années.

#### I.6.1 <u>Le genre Brucella</u>

Les *Brucellae* sont des bactéries appartenant à la classe de  $\alpha$ -protéobactéries, tout comme de nombreuses autres espèces vivant en association avec un hôte eucaryote. Ce groupe inclut des bactéries intracellulaires obligatoires (*Rickettsia*), des bactéries intracellulaires facultatives (*Bartonella, Brucella*), des bactéries extracellulaires (*Agrobacterium*) ainsi que des symbiontes de plantes et d'animaux (*Sinorhizobium, Wolbachia*) (Moreno *et al.*, 1990). Souvent considérées comme bactéries intracellulaires facultatives, les *Brucellae* sont pourtant mieux adaptées au mode de vie intracellulaire. Il a de ce fait été proposé qu'elles soit qualifiées de bactéries extracellulaires facultatives (Moreno and Moriyon, 2002).

Les bactéries du genre *Brucella* sont classées en six espèces suivant leur hôte préférentiel, bien qu'elle puissent occasionnellement infecter d'autres hôtes: *B. melitensis* (caprins), *B. abortus* (bovins), *B. canis* (cannidés), *B. suis* (suidés), *B. ovis* (ovins), et *B. neotomae* (rat du désert). Les quatre premières espèces sont infectieuses pour l'homme, *B. melitensis* étant cependant responsable de la majorité des infections humaines. Deux nouvelles espèces ont été isolées à partir de mammifères marins et nommées *B. pinnipediae* et *B. cetaceae* (Ewalt *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1996).

Le génome de *Brucella* est réparti sur deux chromosomes circulaires, un grand chromosome de 2.1Mb et un petit de 1.2 Mb (excepté pour *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un chromosome de 3.2 Mb). L'ensemble du génome contient environ 3200 séquences codantes. Le séquençage des génomes de *B. melitensis*, *B. suis* et *B. abortus* a révélé que ces espèces sont très proches (DelVecchio *et al.*, 2002 ; Paulsen *et al.*, 2002 ; Halling *et al.*, 2005). Par exemple, les génomes de *B. melitensis* et *B. suis* ne différent que par 74 gènes (42 sont uniques à *B. suis* et 32 à *B. melitensis*), ce qui est peu comparé aux génomes d'autres pathogènes du même genre (voir Figure 35).



**Figure 35 :** Comparaison d'analyses génomiques entre espèces différant par leur hôte préférentiel ou par leur pathogénicité. Chaque barre représente le nombre de gènes unique comparé au génome proche associé sous forme de % du génome. Le nombre indiqué à côté de chaque barre correspond au nombre de gènes uniques. L'astérisque indique que les prophages de *L. monocytogenes* et *L. innocua* ont été exclus de l'analyse. D'après Tsolis, 2002.

Les génomes de *B. melitensis* et *B. abortus* diffèrent quant à eux majoritairement par la présence d'un locus de 25 kb chez *B. melitensis*. Ce locus semble être impliqué dans la synthèse de polysaccharide(s) (Vizcaino *et al.*, 2001). D'autre part, le séquençage de ces trois génomes n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'îlots de pathogénicité ou de facteurs de virulence classiques (exotoxines, capsule, fimbriae...) (Moreno and Moriyon, 2002), ouvrant de nombreuses questions sur les mécanismes moléculaires de la virulence de *Brucella*.

#### I.6.2 La brucellose

La brucellose, ou fièvre de Malte, est la zoonose la plus répandue dans le monde, elle est responsable de plus de 500 000 nouveaux cas par an (Corbel, 1997 ; Pappas *et al.*, 2005). Chez les animaux, la brucellose est associée à des avortements et une infertilité responsables de pertes économiques considérables, en particulier dans les pays en voie de développement (Smith and Ficht, 1990). Chez l'homme, c'est une maladie chronique, souvent incapacitante présentant un faible taux de mortalité. La grande diversité et l'aspécificité des symptômes que cause cette maladie (fièvre, fatigue, perte de poids, anorexie...) rend le diagnostic souvent délicat.

La brucellose n'est pas considérée comme une maladie contagieuse chez l'homme car seuls de très rares cas de contagions inter-humaine ont été décrits (Godfroid *et al.*, 2005). Les voies majeures de contamination sont le contact direct avec les animaux contaminés (éleveurs, vétérinaires, bouchers...) et la consommation de produits laitiers non pasteurisés et de viande contaminée insuffisamment cuite. La contamination par inhalation est la plus courante bien qu'elle puisse également avoir lieu par contact direct avec des plaies.

Le traitement est basé sur une antibiothérapie de longue durée (doxycycline et rifampicine). Des vaccins vétérinaires atténués sont disponibles et ont contribué aux programmes d'éradication de la brucellose, mais ils restent virulents pour l'homme (Schurig *et al.*, 2002).

*Brucella* est d'autre part considérée comme arme biologique potentielle de par la chronicité de la maladie qu'elle induit, le traitement long et coûteux qu'elle nécessite, la transmission par aérosol et l'absence de vaccin efficace chez l'homme (Pappas *et al.*, 2006a).

#### I.6.2.1 Découverte de la brucellose

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, une fièvre ondulante sévissait à l'état endémique sur l'île de Malte où des troupes britanniques étaient localisées. Le médecin David Bruce, officier britannique fut le premier à isoler en 1887 l'agent responsable de cette maladie à partir de rates de soldats décédés, il le nomma *Micrococcus melitensis*. Quelques années plus tard, le maltais Zammit démontra la nature zoonotique de la fièvre de Malte en isolant le même organisme du lait et du sang de chèvres présentes sur l'île et identifie le lait comme la source de contamination humaine.

Les Danois Bang et Stribolt isolent de façon indépendante en 1895 l'agent responsable de l'avortement des bovidés qui sera nommé ultérieurement *Bacterium abortus*. Alice Evans démontra en 1918 que *M. melitensis* et *B. abortus* ne sont pas distinguables sur base de caractères morphologiques et biochimiques. Le genre *Brucella* est créé deux ans plus tard en hommage à David Bruce et regroupe alors les espèces *B. melitensis* et *B. abortus*.

#### I.6.2.2 Prévalence actuelle de la brucellose

Malgré les techniques disponibles de nos jours, la brucellose reste une zoonose majeure dans le monde actuel. L'éradication de la brucellose est un but visé par de nombreux pays. Les programmes d'éradication sont basés sur la vaccination des animaux d'élevage, le dépistage régulier de la brucellose au sein des troupeaux et l'abattage des animaux infectés (Corbel, 1997). La mise en place de ces précautions dépend cependant des conditions socio-économiques du pays ainsi que de la prévalence de la brucellose dans ce dernier. Plusieurs pays d'Europe du nord ont ainsi réussi à éradiquer cette zoonose (Angleterre, Belgique, Allemagne...) (Pappas *et al.*, 2006b). Ces pays maintiennent cependant une surveillance accrue de la brucellose car le risque de réintroduction reste présent, notamment à cause des mouvements de bétails et de certaines espèces animales sauvages pouvant constituer un réservoir infectieux.

La brucellose reste cependant endémique dans de nombreux pays en voie de développement qui continuent à subir le poids tant économique que médical de cette maladie (Pappas *et al.*, 2006b). Certains pays de l'union européenne (Grèce, Espagne Portugal, sud de l'Italie) possèdent également des foyers infectieux (voir Figure 36). Les zones touchées par la brucellose humaine colocalisent avec celles touchées par la brucellose animale et concerne tout particulièrement les personnes travaillant avec les animaux infectés ou consommant leurs produits dérivés (viande crue, produits laitiers...).



Figure 36 : Incidence mondiale de la brucellose humaine. D'après Pappas et al., 2006b.

L'apparition de nouveaux foyers infectieux ces dix dernières années, notamment en Asie centrale et en Syrie, démontrent que l'éradication de la brucellose à l'échelle mondiale ne sera pas une tache aisée, malgré les programmes d'éradication en cours. Le contrôle de la brucellose humaine passe par celui de la brucellose animale. Le coût de cette surveillance est très élevé et nécessite la mise au point de tests fiables, simples et peu coûteux de détection des animaux infectés (Boschiroli *et al.*, 2001).

#### I.6.3 <u>Adaptation de Brucella à l'hôte</u>

Contrairement à ce qui a été mis en évidence chez d'autres bactéries pathogènes, le génome de *Brucella* ne code pas pour des facteurs de virulence classiques (exotoxine, capsule, fimbria, phages, formes de résistance...). Il semble donc que la virulence de cette bactérie soit basée sur son

faible effet toxique et stimulateur sur les cellules hôte (Barquero-Calvo *et al.*, 2007), ainsi que sur les déterminants moléculaires permettant de pénétrer dans ces cellules, d'inhiber la fusion phagolysosomiale (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a) et de former une niche de réplication permettant sa prolifération, sans induire de programme de mort cellulaire (Gross *et al.*, 2000) comme nous le verrons ci-dessous.

#### I.6.3.1 Trafic intracellulaire de Brucella

La virulence des bactéries du genre *Brucella* est basée sur leur capacité à survivre et à se multiplier au sein des cellules phagocytaires professionnelles (macrophages, neutrophiles...) et non professionnelles (cellules du trophoblaste) de l'hôte (Ficht, 2003, Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a; Detilleux *et al.*, 1990; Celli, 2006). Les infections causées par *Brucella* dans leurs hôtes naturels ainsi que chez l'homme sont caractérisées par un caractère chronique. La survie dans les macrophages est essentielle à l'établissement de la chronicité de l'infection (Gorvel and Moreno, 2002) car elle met *Brucella* à l'abri des défenses extracellulaires de l'hôte (anticorps, complément...). Les macrophages étant les cellules cibles majeures de *Brucella* (Gorvel and Moreno, 2002), les paragraphes suivants décrivent brièvement le trafic des vacuoles contenant *Brucella* dans ce type cellulaire.

Les *Brucellae* entrent dans leur organisme hôte en adhérant aux muqueuses (bucale, respiratoire, gastro-intestinale, conjonctivale ou génitale) (Enright, 1990) et traversent leur épithélium. Elles sont ensuite ingérées par les cellules phagocytaires résidentes et rejoignent les ganglions lymphatiques proches.

Les TLRs (Toll-Like receptors) interviennent dans les mécanismes de l'immunité innée afin de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes (PAMPs ou Pathogen Associated Molecular Pattern) et de déclencher une réponse adaptée en cas d'intéraction avec ces molécules. Le LPS est un PAMP classiquement reconnu par le TLR4. L'intéraction entre ces deux partenaires conduit à la production de molécules pro-inflamatoires telles le TNF- $\alpha$ . Le LPS des batéries du genre *Brucella* possède une structure particulière (voir paragraphe I.6.3.2) qui lui confère une faible cytotoxicité et un faible effet stimulateur des cellules immunitaires (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). L'activation de la voie dépendante du TLR4 par le LPS de *B. abortus* nécessite des quantités importantes de cette molécule en comparaison avec le LPS classique des entérobactéries (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Deplus ce il n'a que peu d'influence sur la production de cytokines (Lapaque et al., 2005). Il a été proposé que *Brucella* utiliserait des PAMPs non-conventionnels afin d'atteindre sa niche de réplication avant l'activation des mécanismes antimicrobiens mis en place par l'immunité adaptative (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

Les mécanismes par lesquels *Brucella* se lie et pénètre dans les cellules hôtes sont encore mal connus. Il a toutefois été démontré que les «lipid rafts » (microdomaines membranaires riches en cholestérol) sont nécessaires à l'entrée de *Brucella* dans la cellule, suggérant que les récepteurs pour cette bactérie sont présents dans ces régions lipidiques particulières (Watarai *et al.*, 2002 ; Celli, 2006). Deux récepteurs potentiels ont été proposés, mais leur implication reste controversée :

 $\blacktriangleright$  La protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>) (Watarai *et al.*, 2003). La protéine prion PrP<sup>c</sup> est ubiquitaire et très conservée chez les mammifères. La protéine PrP<sup>c</sup> possède une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), suggérant une association avec les « lipid-raft ». Une étude a suggéré que cette dernière serait le récepteur de l'Hsp60 (GroES/L) de *B. abortus* (Watarai *et al.*, 2003) et le médiateur de l'internalisation de *Brucella*. Une étude récente a cependant avancé des arguments contradictoires puisque des macrophages ou des souris knock-out pour le gène du prion sont toujours susceptibles à l'infection par *Brucella*. De même, l'utilisation d' anticorps dirigés contre cette protéine n'affecte pas l'intenalisation des bactéries (Fontes *et al.*, 2005).

La protéine récepteur Scavenger de classe A (SR-A) (Kim *et al.*, 2004). Les protéines scavanger ont initialement été définies quant à leur capacité à lier et à internaliser des lipoprotéines modifiées. Les macrophages expriment au moins six types différents de récepteurs scavangers. Parmi eux, le récepteur scavenger de type A (SR-A) joue entre autre un rôle particulier dans l'immunité innée. Il a par exemple été démontre que SR-A est capable de reconnaître le lipide A des molécules de type LPS et qu'il médie l'internalisation de *Staphylococcus aureus* et de *Neisseria meningitidis* (pour revue voir Greaves *et al.*, 2005). Une étude a mis en évidence l'implication de SR-A dans l'internalisation de *B. abortus*. Les auteurs ont proposé que SR-A serait recruté dans les « lipid-raft » de façon *virB*-dépendante (Kim *et al.*, 2004). Ce modèle est cependant critiqué puisque plusieures études ont montré que le système de sécrétion VirB n'est pas impliqué dans les étapes précoces de l'infection (Lapaque *et al.*, 2005 ; Celli *et al.*, 2003).

En comparaison avec d'autres pathogènes, tels *Salmonella*, *Shigella* ou *Legionella*, peu de *Brucella* virulentes se lient aux phagocytes professionnels et non professionnels (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a ; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998b). Cependant, une fois l'étape d'attachement accomplie la quasi-totalité des bactéries entrent dans les cellules par un mécanisme encore controversé.

*Brucella* contrôle son propre trafic intracellulaire afin d'inhiber la fusion phagolysosomiale qui conduirait à sa destruction (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a). Dans les cellules phagocytaires professionnelles, les phagosomes contenant *Brucella* (*« Brucella* containing vacuole » : BCV) fusionnent avec les endosomes précoces (Celli *et al.*, 2003). L'acidification de ce compartiment membranaire est indispensable à la survie de *Brucella* (Porte *et al.*, 1999). Ces vacuoles ne fusionnent ni avec les endosomes tardifs ni avec les lysosomes et il a été démontré que leur pH est également acidifié (Kohler *et al.*, 2003). Les BCVs interagissent alors avec le réticulum endoplasmique, ces interactions conduisent à la formation de la vacuole réplicative (Celli *et al.*, 2003; Celli and Gorvel, 2004) (voir Figure 37). La réplication de *Brucella* semble ensuite avoir lieu par fission des BCVs en deux BCVs filles grâce à de nouveaux apports membranaires durant des interactions avec le réticulum endoplasmique (Celli, 2006).

Le trafic intracellulaire de *Brucella* a également été étudié dans un modèle de cellule phagocytaire non-professionnelle (cellules HeLa). Il a été mis en évidence que dans ce type cellulaire, *B. abortus* évite la fusion avec les endosomes tardifs et est associée avec un compartiment possédant les caractéristiques des autophagosomes (Pizzaro-Cerda *et al.*, 1998a). L'autophagie est un processus lysosomal jouant un rôle important dans le maintient de l'homéostasie cellulaire. Elle est notamment impliquée dans la dégradation d'organelles défectueuses ou surnuméraires ainsi que dans les défenses anti-bactériennes mises en place par l'immunité innée (Dorn *et al.*, 2002, Ogawa *et al.*, 2006). Plusieurs pathogènes intracellulaires (*Legionella pneumophila, Porphyromonas gingivalis, B. abortus*) dévient le trafic endosomal, sont associées à des compartiments de type autophagosome et inhibent leur fusion avec les lysosomes. Chez *Brucella* cependant, cette caractéristique semble être type-cellulaire dépendante puisque cette bactérie n'est retrouvées associée à des structures de type autophagosome que dans les cellules non-phagocytraires.

Plusieurs structures de *Brucella* sont impliquées dans la déviation du trafic intracellulaire. Les structures principales sont décrites dans le paragraphe suivant.



**Figure 37:** Trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules hôtes de type macrophage. Suite à son entrée dépendante du LPS et des « lipid raft » dans les phagosomes, les *Brucella* sont contenues dans les BCV (*Brucella* containing vacuoles) précoces qui interagissent avec les endosomes précoces. Les BCVs maturent ensuite en vacuoles intermédiaires acidifiées. Ces vacuoles n'interagissent ni avec les endosomes tardifs, ni avec les lysosomes. Le LPS et les  $\beta$ -1, 2-glucans cycliques sont nécessaires à cette déviation du trafic intracellulaire normal. Les vacuoles intermédiaires interagissent avec le réticulum endoplasmique afin de former les vacuoles réplicatives. Ces interactions sont dépendantes du système de sécrétion de type IV VirB dont l'expression est activée par l'acidification des vacuoles. La réplication semble alors avoir lieu par fission des BCVs en deux BCVs filles. D'après Celli, 2006.

#### I.6.3.2 Déterminants moléculaires de la virulence de Brucella

Plusieurs déterminants moléculaires nécessaires à la déviation du trafic intracellulaire ont été mis en évidence (voir Figure 37) :

 $\blacktriangleright$  Le lipopolysaccharide (LPS) des *Brucellae* possède une structure particulière : le lipide A possède une longue chaîne acyl, et possède un squelette de diaminoglucose plutôt que de glucosamine. De part cette structure inhabituelle, il possède une très faible endotoxicité et protège *Brucella* des peptides cationiques antibactériens et de la fixation du complément (Lapaque *et al.*, 2005). La chaîne O du LPS joue également un rôle crucial dans l'entrée de *Brucella* dans les cellules hôtes via les « lipid rafts » et durant les premières phases de la survie intracellulaire (Porte *et al.*, 1999).

 $\triangleright$  Les β-1,2-glucans cycliques sont des composés périplasmiques produits par les αprotéobactéries chez lesquelles ils jouent un rôle important dans l'osmorégulation (Bohin, 2000). Chez *Brucella*, des mutants du gène *cgs* codant pour la synthase de ce composé sont fortement atténués de par leur incapacité à inhiber la fusion phagolysosomiale. Les β-1,2-glucans cycliques sont nécessaires à la déviation du trafic intracellulaire (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005 ; Briones *et al.*, 2001). Ces composés sont sécrétés par *Brucella* et disruptent les « lipid rafts » de la membrane des phagosomes. Ces domaines membranaires de composition particulière étant impliqués dans la maturation des phagosomes, les  $\beta$ -1,2-glucans cycliques pourraient donc interférer avec le trafic des phagosomes (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

> Le système de sécrétions de type IV (permettant la sécrétion de molécules effectrices dans la cellule hôte) encodé par l'opéron *virB* est exprimé durant l'infection cellulaire (Boschiroli *et al.*, 2002). Bien que les molécules effectrices sécrétées par ce système de sécrétion soient inconnues, VirB est nécessaire pour maintenir les interactions entre les BCVs et le réticulum endoplasmique conduisant à la formation des vacuoles réplicatives (Comerci *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003). Les différentes espèces de *Brucella* mutées dans l'opéron *virB* sont toujours capables de dévier les premières étapes du trafic intracellulaire (inhibition de la fusion avec les endosomes tardifs) mais sont ensuite dirigées dans les phagolysosomes où elles sont détruites (voir Figure 37). Ces mutants sont de ce fait fortement atténués dans tous les modèles cellulaires testés ainsi qu'en modèle murin (O'Callaghan *et al.*, 2001). D'autre part, l'expression de ce système de sécrétion de type IV (type four secretion system ou TFSS) est dépendante de l'acidification des BCVs (Porte *et al.*, 1999).

➢ Le système à deux composants BvrR/BvrS est impliqué dans l'internalisation de Brucella dans les phagocytes professionnels et non-professionnels (Sola-Landa et al., 1998). Ce système de régulation est impliqué dans la maintenance de l'homéostasie de la membrane externe de Brucella (Lamontagne et al., 2007; Manterola et al., 2005). La synthèse de plusieurs protéines de membrane externe est affectée dans un mutant de ce système de transduction du signal, tout comme la structure du LPS. Un tel mutant est incapable de pénétrer dans les cellules hôtes (Guzman-Verri et al., 2002).

# I.6.3.3 Réponse aux stress rencontrés lors de l'infection

Durant le trafic intracellulaire, *Brucella* est confronté à de nombreux stress (Roop *et al.*, 2004):

Stress oxydatif dû aux intermédiaires réactifs de l'oxygène libérés par les macrophages suite à l'internalisation de *Brucella* (Jiang *et al.*, 1993 ; Phillips and Roop, 2001).

- Stress acide dans les vacuoles (pH 4 4.5), (Kohler et al., 2003 ; Porte et al., 1999).
- Stress nutritif dans les vacuoles de réplication (Kohler *et al.*, 2003).

Les stratégies mises en place par *Brucella* afin de s'adapter à ses différents stress sont décrites dans les paragraphes suivants.

# I.6.3.3.1 Réponse générale

Lorsque les bactéries passent de la phase logarithmique à la phase stationnaire de croissance, une adaptation physiologique et métabolique leur permet de résister à de nombreux stress environnementaux (stress acide, oxydatif, nutritionnel...). Aucun homologue du gène *rpoS* (codant pour le facteur  $\sigma^{s}$  d'adaptation à la phase stationnaire) n'a été mis en évidence dans le génome de *Brucella* (DelVecchio *et al.*, 2002 ; Paulsen *et al.*, 2002 ; Halling *et al.*, 2005) ni dans les autres génomes d' $\alpha$ -protéobactéries disponibles. Cependant des homologues du gène *hfq*, codant pour une petite protéine capable de lier l'ARN (Host Factor-1 ou HF-1, voir paragraphe I.5.2.1), ont été trouvés dans tous les génomes séquencés de *Brucella*. Des mutants de ce gène sont incapables de s'adapter aux conditions de phase stationnaire et présentent une forte sensibilité au pH acide et au stress oxydatif ainsi qu'une forte atténuation de la virulence en modèle cellulaire et murin (Robertson and Roop, 1999).

Les cibles de HF-1 ne sont pas encore définies, mais il a été démontré que cette « RNAbinding protein » est nécessaire à l'activation de l'opéron cydAB chez *B. abortus* (Roop *et al.*, 2003). Cet opéron code pour la cytochrome oxydase *bd* qui possède une haute affinité pour l'O<sub>2</sub> et participerait à l'adaptation de *Brucella* aux conditions de microaérobiose rencontrées dans l'hôte (Endley *et al.*, 2001). La surproduction de la catalase ou de la Cu/Zn-superoxide dismutase de *B. abortus* dans un mutant *cydB* réduit l'atténuation en modèle murin (Endley *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que l'opéron *cydAB* joue rôle dans la résistance au stress oxydatif chez *B. abortus*.

La réponse aux stress de Brucella n'est cependant pas limitée à HF-1 :

 $\succ$  La protéase ATP-dépendante Lon joue un rôle principal dans la dégradation des protéines endommagées par différents stress environnementaux. De part l'atténuation d'un mutant *lon* dans les périodes initiales de l'infection en souris, il a été proposé que cette protéase est essentielle à *Brucella* durant les stades précoces de l'infection (Robertson *et al.*, 2000).

Els protéines de la famille Clp ATPases (Caseino lytic protease) sont très conservées au sein des génomes bactériens. Les chaperonnes ClpA, ClpB et ClpX peuvent former des complexes avec la protéase ClpP afin de dégrader les protéines endommagées. Il a été démontré que ClpA est impliqué dans la dégradation de protéines anormales/dénaturées chez *B. suis* (Ekaza *et al.*, 2000). Le mutant *clpB* montre quant à lui une sensibilité au pH acide et au stress oxydatif (Ekaza *et al.*, 2001).

➢ En condition de stress, les bactéries activent l'expression de gènes codant pour des protéines de réponse au stress (hsp : « heat shock protein »). Les protéines hsp ont pour rôle de préserver les fonctions cellulaires. Il a été démontré que lors de la croissance intracellulaire, *Brucella* induit plusieurs de ces protéines (DnaK, GroESL...) (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996).

#### I.6.3.3.2 Réponse au stress oxydatif

Le génome de *Brucella* code pour plusieurs protéines capables de détoxifier les dérivés réactifs de l'oxygène produits par les macrophages lors de l'infection. Le génome de *B. abortus* code entre autres pour deux superoxide dismutases (SOD), l'une cytoplasmique (Mn-SOD) et l'autre périplasmique (Cu/Zn-SOD), et pour une catalase périplasmique (Moreno, 2001). La localisation périplasmique de deux de ces enzymes suggère qu'elles sont impliquées dans la protection de *Brucella* vis-à-vis des sources externes de stress oxydatif (Stabel *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 2000 ; Tatum *et al.*, 1992).

*Brucella* est également capable de se débarrasser des protéines altérées par le stress oxydatif. La protéine HtrA, une sérine protéase périplasmique de choc thermique, est impliquée dans la dégradation des protéines oxydées endommagées. La mutation du gène *htrA* entraîne une sensibilité accrue de *Brucella* aux substances oxydantes ainsi qu'une atténuation de la survie intracellulaire (Elzer *et al.*, 1994 ; Phillips *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1997).

#### I.6.3.3.3 Réponse au stress acide

L'expression des protéines HtrA, GroEL et DnaK est induite en milieu acide (Teixeira-Gomes *et al.*, 2000 ; Rafie-Kolpin *et al.*, 1996). DnaK est impliquée dans la réponse aux stress acide et oxydatif (Kohler *et al.*, 2002b) et est essentielle à la survie de *Brucella* au sein des macrophages (Kohler *et al.*, 2002a). Sa fonction précise n'est cependant pas connue à ce jour.

#### I.6.3.3.4 Adaptation métabolique

Les *Brucellae* doivent être capables d'adapter leur métabolisme aux conditions rencontrées au cours de leur cycle infectieux. Plusieurs cribles génétiques ont mis en évidence que de nombreux mutants affectés dans des voies métaboliques sont atténués en modèles cellulaires et/ou en modèle murin (Foulongne *et al.*, 2000 ; Hong *et al.*, 2000 ; Lestrate *et al.*, 2000; Lestrate *et al.*, 2003 ; Delrue *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2003). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que *Brucella* rencontrerait lors de l'infection cellulaire des compartiments de compositions nutritives différentes, nécessitant l'adaptation métabolique de la bactérie (Kohler *et al.*, 2003).

De nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés valine, leucine, isoleucine, serine, thréonine, histidine et cystéine, sont nécessaires à la virulence de *Brucella* dans plusieurs modèles d'infection. De même certains transporteurs permettant l'importation de ces métabolites sont nécessaires à la survie dans l'hôte (Delrue *et al.*, 2004).

En ce qui concerne le métabolisme des sucres, il a été démontré que les voies de dégradation du maltose, de l'arabinose, du ribose, du galactose, du glucose, de l'inositol et du glycérol et de l'érythritol sont essentiels à la survie intracellulaire de *Brucella* (Essenberg *et al.*, 2002). De nombreux gènes impliqués dans le transport et le catabolisme de ces sucres sont indispensables à la virulence de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2004). Cinq de ces gènes sont notamment impliqués dans la voie des pentoses phosphate, une voie métabolique capitale pour *Brucella* qui ne possède pas de phosphofructokinase, enzyme essentielle de la glycolyse (Essenberg *et al.*, 2002).

Récemment, il a été proposé que la réponse de stringence jouerait un rôle dans l'adaptation métabolique de *Brucella* lors de l'infection. La réponse de stringence est un système de régulation pléiotropique permettant aux bactéries de s'adapter aux conditions de famine. Elle est médiée par les ppGpp, de petites molécules produites par les bactéries en réponse à une carence en acides aminés et autres composés métaboliques (Magnusson *et al.*, 2005). Ces molécules sont synthétisées les protéines RelA/SpoT et modifient la compétition entre facteur sigma pour la liaison à l'ARN-polymérase. Chez *Brucella*, il a récemment été démontré que Rsh (RelA/SpoT homologue) est impliquée dans la survie en conditions de stress et en macrophages ainsi que dans l'activation de l'opéron *virB* (Dozot *et al.*, 2006).

# I.7 Le Quorum Sensing chez Brucella melitensis

Durant son cycle infectieux, les *Brucellae* sont confrontées à des environnements très variés. Elles doivent notamment faire face à de nombreuses substances bactéricides (complément, anticorps, peptides cationiquues..) dans le milieu extracellulaire et à de nombreuses stratégies antibactériennes intracellulaire. Une régulation fine des déterminants moléculaires permettant l'adaptation à ces différents environnements semble donc nécessaire à l'établissement de l'infection.

La découverte d'un système de QS chez *Brucella*, système de régulation souvent impliqué dans la régulation de facteurs de virulence, a soulevé de nombreuses questions quant à son implication potentielle dans la régulation des gènes nécessaires à l'adaptation à l'hôte, notamment de part le caractère intracellulaire de cette bactérie.

#### I.7.1 AHLs et AHL-synthase

L'analyse du surnageant de culture de *B. melitensis* a permis de mettre en évidence deux types d'AHLs : la  $C_{12}$ -HSL (dodécanoyl-HSL), caractérisée par spectrométrie de masse et la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL (3-oxo- dodécanoyl-HSL), identifiée sur base d'un profil de chromatographie en couche

mince (TLC) (Taminiau *et al.*, 2002). La 3-oxo- $C_{12}$ -HSL n'a pas pu être identifiée par spectrométrie de masse, probablement en raison de sa faible concentration. En effet, dix-huit litres de surnageant de culture ont été nécessaires à l'identification de ces molécules signal. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation : (i) Les conditions de culture utilisées n'étaient peut-être pas optimales quant à l'induction de la production de ces phéromones par *Brucella*. Des signaux particuliers, autres que la densité de population, sont peut-être nécessaires à l'induction du système de QS chez cette bactérie, (ii) si *Brucella* utilise la production d'AHLs lors du stade intracellulaire, de part les limites de diffusion aux sein des BCVs, il est possible qu'une faible production d'AHLs soit suffisante à l'induction de la réponse transcriptionnelle QS-dépendante.

La recherche d'homologues aux gènes codant pour les AHL-synthase de la famille LuxI et LuxM/AinS n'a pas permis de mettre en évidence d'AHL synthase putative chez *Brucella*. Un gène homologue au gène *hdtS* de *P. fluorescens* a cependant été identifié dans le génome de *B. melitensis*. L'étude de ce gène n'a pas permis de mettre en évidence de rôle de l'homologue de HdtS de *B. melitensis* dans la synthèse d'AHLs (Deschamps, 2005). Il semblerait donc d'après ces résultats que la synthèse d'AHLs chez *Brucella* soit catalysée par une nouvelle famille d'AHL-synthase.

#### I.7.2 <u>Régulateurs de type LuxR</u>

Deux régulateurs de type LuxR on été mis en évidence chez *B. melitensis* : VjbR (« vacuolar hijacking *Brucella* Regulator ») et BabR. Le régulateur VjbR (BMEII1116) a été mis en évidence lors d'un crible de mutants transpositionnels visant à mettre en évidence des gènes impliqués dans la survie intracellulaire et la prolifération en cellules HeLa (Delrue *et al.*, 2001). Une souche mutée dans ce gène est incapable d'atteindre sa niche de réplication et de s'y multiplier, elle présente le même trafic intracellulaire que le mutant *virB*. VjbR possède les caractéristiques classiques des régulateurs de type LuxR : (i) présence d'un domaine N-terminal homologue au domaine de liaison aux AHLs, (ii) la conservation des acides aminés impliqués dans la liaison des AHLs chez d'autres régulateur du QS, (iii) un domaine C-terminal de liaison à l'ADN possédant un motif HTH (Delrue *et al.*, 2005).

Le régulateur BabR (BMEI1758) a été mis en évidence lors d'un criblage fonctionnel visant à mettre en évidence l'AHL-synthase de *Brucella*. Dans ce but, une banque d'ADN génomique de *B. abortus* a été criblée afin de mettre en évidence des ORFs capables d'induire un gène rapporteur (codant pour la luciférase) dépendant du régulateur LuxR de *V. fischeri via* la production d'AHLs. Cette souche «biosenseur », dépourvue d'AHL synthase ne produit pas de lumière en absence d'AHLs. Par contre, si on exprime dans cette souche un gène codant pour une AHL-synthase, les AHLs produites se fixent au régulateur LuxR qui active alors la transcription du gène rapporteur en se fixant sur la « *lux box* » de son promoteur. S'il n'a pas permis de mettre en évidence d'AHL-synthase, ce crible a permis l'identification d'un gène codant pour un deuxième régulateur de type LuxR capable d'activer l'expression de la luciférase (Taminiau, 2003), probablement en se fixant directement sur le promoteur de ce gène. Contrairement à ce qui a été observé pour le régulateur VjbR, la délétion de *babR* n'entraîne pas d'atténuation de la virulence, quel que soit le modèle d'infection testé (Taminiau, 2003).

#### 1.7.3 Les cibles du Quorum Sensing chez Brucella

L'étude de l'expression des promoteurs de l'opéron virB et du gène fliF (codant pour le « MS ring » du flagelle de *Brucella*, constituant une partie du corps basal flagellaire) dans la souche sauvage *B. melitensis* a permis de mettre en évidence que ces gènes sont régulés de façon

dépendante de la courbe de croissance en milieu de culture. L'expression de ces deux promoteurs est quasiment nulle dans un mutant vjbR (Delrue *et al.*, 2005). VjbR est donc un activateur transcriptionnel des ces structures de surface, toutes deux impliquées dans la virulence de *Brucella* (Fretin *et al.*, 2005 ; O'Callaghan *et al.*, 1999).

D'autre part l'ajout de  $C_{12}$ -HSL exogène durant la culture en milieu bactériologique conduit à la répression de ces deux promoteurs. Il a donc été proposé que l'effet répresseur des  $C_{12}$ -HSL soit médiée par le régulateur VjbR (Delrue *et al.*, 2005). Les régulateurs de type LuxR décrits sont généralement soit des activateurs en présence d'AHLs, soit des répresseurs inactivés par les AHLs (voir paragraphe I.2.4.4.3). VjbR serait en ce sens un régulateur de type LuxR d'un nouveau genre puisqu'il serait activateur en absence de molécules signal et que ces dernières auraient un rôle répresseur sur son activité.

#### I.7.4 <u>Un système de Quorum Quenching chez Brucella ?</u>

La découverte d'un gène homologue au gène codant pour l'AHL-acylase de *Ralstonia (aiiD)* (Lin *et al.*, 2003) dans le génome de *B. melitensis* a suggéré l'existence d'un système de Quorum Quenching chez cette bactérie. Des expériences en cours au laboratoire ont permis de mettre en évidence que le produit du gène *aiiD* de *B. melitensis* est capable de dégrader différents type d'AHLs et que cette enzyme serait secrétée dans le milieu de culture (Julien Lemaire, thèse en cours).

L'absence d'AHL synthase classique chez *Brucella* et la présence d'un système potentiel de Quorum Quenching posent de nombreuses questions quant au rôle du QS chez cette bactérie. La production d'AHL-acylase par *Brucella* pourrait avoir un rôle protecteur contre les AHLs produites par d'autres espèces bactériennes rencontrées au cours du cycle infectieux ou bien encore servir à réguler le propre système de QS de *Brucella* comme cela a été décrit chez *A. tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002a).

# II Objectifs du travail

La longue co-évolution des *Brucellae* avec leurs hôtes a fait de ces pathogènes intracellulaires des organismes particulièrement bien adaptés aux conditions rencontrées lors de leur cycle infectieux. Il est vraisemblable que *Brucella* régule de façon fine les déterminants moléculaires nécessaires à une telle adaptation en fonction des conditions environnementales. Plusieurs systèmes de régulation permettent de répondre à la présence de stimuli présents dans le milieu extracellulaire. C'est notamment le cas du Quorum Sensing, système de communication permettant la régulation coordonnée de gènes au sein d'une population bactérienne en fonction de la densité de population et/ou des propriétés de diffusion du milieu.

Le système de Quorum Sensing de *Brucella* est constitué de deux régulateurs de type LuxR : BabR et VjbR, d'une AHL identifiée chimiquement ( $C_{12}$ -HSL) ainsi que d'une AHL-acylase en cours de caractérisation (Julien Lemaire, thèse en cours). VjbR et la  $C_{12}$ -HSL partagent des cibles transcriptionnelles (l'opéron *virB* et le gène *fliF* codant pour le MS ring du flagelle). Il a été proposé que l'effet des  $C_{12}$ -HSL sur ces gènes cibles soit médié par VjbR. Nous nous sommes donc dans un premier temps attachés à mettre en évidence un lien direct entre cette molécule signal et le régulateur VjbR.

Le mutant vjbR étant fortement atténué dans tous les modèles d'infection testés, il a été proposé que le système de QS de *Brucella* joue un rôle crucial durant certains stades de l'infection, notamment via l'activation de l'opéron virB. Afin de mieux aborder cette problématique une analyse transcriptomique combinée à une analyse protéomique et métabolique a été mise en oeuvre afin de comparer la souche *B. melitensis* sauvage et le mutant vjbR. Le manque de données concernant le régulateur BabR nous a poussé à réaliser ces mêmes analyses avec le mutant babR.

La découverte de cibles directes de VjbR pourrait permettre de mettre en évidence le site de liaison à l'ADN de ce régulateur. Deux approches ont été utilisées dans ce but : (i) la technique d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP) afin de mettre en évidence des cibles régulées directement par VjbR, (ii) la recherche de motifs conservés au sein des cibles directes et indirectes de VjbR mises en évidence au cours de ce travail.

Ce travail s'organise en deux parties:

- > La mise en évidence d'un lien direct entre les  $C_{12}$ -HSL et VjbR.
- La détection des cibles directes et indirectes de VjbR (approche transcriptomique, approche protéomique et ChIP) pouvant permettre la découverte du site de liaison à l'ADN de VjbR.

# Résultats
## III Résultats

Les résultats de ce travail sont divisés en deux parties :

Au cours de la première partie du travail, nous nous sommes attachés à montrer un lien direct entre le régulateur VjbR et la C<sub>12</sub>-HSL, deux acteurs du QS de B. melitensis possédant des cibles communes. Pour cela, des allèles mutés de vjbR, codant pour des régulateurs mutés dans le domaine prédit de liaison aux AHLs, ont été construits et exprimés dans une souche  $\Delta v j b R$ . Nous avons montré que ces allèles codent pour des régulateurs incapables de lier ces molécules signal. Ces résultats nous suggèrent que l'effet répresseur des C<sub>12</sub>-HSL sur l'opéron virB est médié par VjbR. De plus, nous avons montré que différentes mutations du gène  $v_j b R$  conduisent à un phénotype d'agrégation en culture liquide. La caractérisation de ce phénotype à permis de démontrer la présence d'exopolysaccharide(s) dans ces souches ainsi qu'une dérégulation de nombreuses protéines de membrane externe (OMPs). Les exopolysaccharides étant les composants majeurs de la matrice des biofilms, cette observation suggère pour la première fois que *B. melitensis* pourraient former de telles structures. Il a été montré précédemment que VjbR est un activateur transcriptionnel de deux structures membranaires chez Brucella (le système de sécrétion de type IV et le flagelle). Les données obtenues lors de cette première partie du travail nous ont permis de mettre en évidence de nouvelles structures de surface régulées par VjbR. Nous proposons donc que VjbR est un régulateur majeur de la membrane externe de B. melitensis. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Journal of Bacteriology ».

La deuxième partie du travail à consisté dans un premier temps à la mise en évidence de cibles directes et indirectes de VjbR à l'échelle du génome. Dans ce but, des analyses transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées en parallèle sur la souche *B. melitensis* sauvage et sur les mutants babR et vjbR. Ces analyses ont été complétées par une caractérisation métabolique de ces souches. Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec Julien Lemaire. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mettre en évidence le site de liaison à l'ADN reconnu par VjbR. Deux approches ont été utilisées : (i) la technique d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP), afin de mettre en évidence des régions du génome directement liées par VjbR, (ii) l'utilisation de programmes de recherche de motifs conservés à partir des données obtenues par transcriptomique, protéomique et ChIP. L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence que VjbR régule 9% du génome de B. melitensis en phase exponentielle de culture. Un pourcentage important des gènes cibles de ce régulateur code pour des protéines membranaires, confirmant ainsi les conclusions tirées de la première partie de ce travail. VjbR régule de nombreux gènes impliqués dans la virulence de Brucella (réponse au stress, métabolisme, structures de surface...), nous proposons donc que ce régulateur joue un rôle crucial dans l'adaptation de Brucella à son hôte. La technique de ChIP a permis de mettre en évidence plusieurs cibles directes de VjbR, cependant les différentes analyses de recherche de motif réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de séquences conservées au sein des cibles du régulateur. L'ensemble des ces résultats fait l'objet d'un deuxième article en préparation.

# **III.1** Recherche d'un lien direct entre VjbR et les C<sub>12</sub>-HSL : caractérisation de mutants dans le domaine de liaison aux AHLs

III.1.1 <u>«Mutations of the Quorum Sensing-dependant regulator VjbR lead to drastic surface</u> <u>modifications in Brucella melitensis »</u>

## **Participation des auteurs :**

Sophie Uzureau a réalisé les constructions utilisées lors de ce travail ainsi que le suivi de l'expression du promoteur *virB*, les dot blots et les tests ELSA. L'analyse microscopique (microscopie confocale et microscopie à balayage) a été réalisée par Marie Godefroid et Sophie Uzureau. Chantal Deschamps et Sophie Uzureau ont effectué les infections cellulaires. Marie Godefroid et Julien Lemaire ont réalisé les tests de sensibilité à la polymixine B. Le manuscrit a été rédigé par Sophie Uzureau. Jean-Jacques Letesson et Xavier De Bolle ont supervisé l'ensemble de ce travail.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Aug. 2007, p. 6035–6047 0021-9193/07/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.00265-07 Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

## Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*<sup>⊽</sup>

Sophie Uzureau, Marie Godefroid, Chantal Deschamps,† Julien Lemaire, Xavier De Bolle, and Jean-Jacques Letesson\*

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium

Received 16 February 2007/Accepted 21 May 2007

Successful establishment of infection by bacterial pathogens requires fine-tuning of virulence-related genes. Quorum sensing (QS) is a global regulation process based on the synthesis of, detection of, and response to small diffusible molecules, called *N*-acyl-homoserine lactones (AHL), in gram-negative bacteria. In numerous species, QS has been shown to regulate genes involved in the establishment of pathogenic interactions with the host. *Brucella melitensis* produces *N*-dodecanoyl homoserine lactones ( $C_{12}$ -HSL), which down regulate the expression of flagellar genes and of the *virB* operon (encoding a type IV secretion system), both of which encode surface virulence factors. A QS-related regulator, called VjbR, was identified as a transcriptional activator of these genes. We hypothesized that VjbR mediates the  $C_{12}$ -HSL effects described above. *vjbR* alleles mutated in the region coding for the AHL binding domain were constructed to test this hypothesis. These alleles expressed in *trans* in a  $\Delta vjbR$  background behave as constitutive regulators both in vitro and in a cellular model of infection. Interestingly, the resulting *B*. *melitensis* strains, unable to respond to AHLs, aggregate spontaneously in liquid culture. Preliminary characterization of these strains showed altered expression of some outer membrane proteins and overproduction of a matrix-forming exopolysaccharide, suggesting for the first time that *B*. *melitensis* could form biofilms. Together, these results indicate that QS through VjbR is a major regulatory system of important cell surface structures of *Brucella* and as such plays a key role in host-pathogen interactions.

Brucella spp. are gram-negative intracellular pathogens belonging to the  $\alpha$ -2 proteobacteria group, like Agrobacterium, Rhizobium, and Rickettsia, which also live in close association with a eukaryotic host (46). Bacteria of the genus Brucella are the etiologic agents of brucellosis, a worldwide zoonosis affecting a broad range of mammals and triggering important economic losses (63). Three Brucella species, B. melitensis, B. abortus, and B. suis, are able to infect humans, causing a chronic, debilitating disease with severe, sometimes fatal outcomes.

Brucellae are remarkably well adapted to the intracellular lifestyle, being able to invade and to survive within macrophages and nonprofessional phagocytes (17, 51). This is one of the bases for the still poorly understood chronicity of brucellosis (26). This aptitude relies on the perturbation of vesicular trafficking and the creation of a unique intracellular replication niche derived from the endoplasmic reticulum (7, 8).

*Brucella* is confronted with very diverse environments and host defenses both in the extracellular milieu and inside host cells. It is thus expected that this pathogen has to sense external and internal signals to achieve successful adaptation throughout its infectious cycle. Among such systems, quorum sensing (QS), stringent response, and signal transduction through two-component regulators have been particularly well studied (for a review, see reference 40). In this study we focused on QS, a communication system used by a large number of bacteria to coordinate gene expression within a population according to population density (30) or limited diffusion in a restricted environment (53). In gram-negative bacteria, this communication system involves the synthesis, release, and subsequent detection of small diffusible molecules or autoinducers (commonly acyl homoserine lactones [AHLs]). As the bacterial population expands, the extracellular concentration of AHLs increases. When the autoinducer concentration reaches a threshold level, AHLs bind to LuxR-type transcriptional regulators comprising an N-terminal AHL binding domain and a C-terminal DNA binding domain containing a helix-turn-helix motif. This interaction leads to conformational changes of the regulator and subsequent modifications of target gene transcription. The phenotypes regulated by QS are as diverse as bioluminescence (37), competence (49), biofilm formation (44), and virulence (50, 75, 78).

We identified two LuxR-type regulators in the sequenced *B.* melitensis genome (16), the previously described VjbR regulator (BMEI1116) (14) and a second regulator, currently undergoing characterization, called BabR (BMEI1758). Despite several attempts, we were not able to identify an AHL synthetase in *B. melitensis*. However, we have previously identified *N*-dodecanoyl-DL-homoserine lactone ( $C_{12}$ -HSL) from *B. melitensis* culture supernatant (73).  $C_{12}$ -HSL represses the transcription of the flagellar gene *fliF* (14) and of the *virB* operon (73), whereas VjbR is a transcriptional activator of these two surface-associated virulence factors (16). The *fliF* gene encodes the flagellar MS ring monomer implicated in the establishment of chronic

75

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium, Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, rue de Bruxelles 61, 5000-Namur, Belgium. Phone: (32) 81 72 44 02. Fax: (32) 81 72 42 97. E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be.

<sup>†</sup> Current address: Departement de Biologie Cellulaire, Institut Cochin, F-75014 Paris, France.

<sup>&</sup>lt;sup>v</sup> Published ahead of print on 8 June 2007.

### 6036 UZUREAU ET AL.

I. BACTERIOL

Strain or plasmid	Palavant characteristical	Source or reference
Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source of reference
<i>B. melitensis</i> strains 16M	Wild type, Nal <sup>r</sup>	A. Macmillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom
CD100	$\Delta v j b R$ ::Kan <sup>r</sup>	14
CD110	$\Delta v j b R$ ::Kan <sup>r</sup> , pJD27 PvirB Amp <sup>r</sup>	14
SB200	$\Delta v j b R$ ::Kan <sup>r</sup> omp31::Cm <sup>r</sup>	This study
B. abortus strains		
2308	Wild type, Nal <sup>r</sup>	54
RMD100	$\Delta v j b R$ ::Kan <sup>r</sup>	RM. Delrue, unpublished
E. coli strains		data
DH10B	$F^-$ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 lacX74 recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara leu)7697 galU galK $\lambda^-$ rps (Str <sup>r</sup> ) nupG	Gibco BRL
S17-1(λ pir)	recA thi pro hsdR [res-mod+][RP4::2-Tc::Mu-Km::Tn7] \pir phage lysogen	61
Plasmids		
pSK-oriT cat	Suicide vector, Cm <sup>r</sup>	I. Danese and P. Lestrate, unpublished data
pSB001	pSK-oriT cat derivative carving a 500-bp internal fragment of BMEII0844	This study
pJD27 PvirB	PvirB-luxAB, Amp <sup>r</sup>	14
pDONR201	Gateway vector, Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pSB101	pDONR carrying the PCR product vjbR	This study
pSB102	pDONR carrying the PCR product $vjbR(\Delta 1-180)$	This study
pSB103	pDONR carrying the PCR product $vjbR(D82A)$	This study
pMR10-cat	Broad-host-range cloning vector, RK2 OriV Cmr Kanr	A. A. Bourniquel
pRH001	pMR10 derivative gateway destinantion vector, medium copy number, Cmr	34
pSB201	pRH001 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR	This study
pSB202	pRH001 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR( $\Delta$ 1–180)	This study
pSB203	pRH001 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR(D82A)	This study
pBBR1-MCS1	Broad-host-range cloning vector, Cmr	38
pRH002	pBBR1-MCS1 derivative gateway destination vector, high copy number, rep, Cmr	34
pSB301	pRH002 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR	This study
pSB302	pRH002 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR( $\Delta 1-180$ )	This study
pSB303	pRH002 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR(D82A)	This study
pSB305	pRH002 derivative, Plac-controlled synthesis of Omp31 (BMEII0844)	This study
pRH018	pRH002 derivative allowing C-terminal fusion with 13Myc tag	34
pSB401	pRH018 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR-13Myc	This study
pSB402	pRH018 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR( $\Delta 1$ -180)-13Myc	This study
pSB403	pRH018 derivative, Plac-controlled synthesis of VjbR(D82A)-13Myc	This study

T.	ABLE	1.	Bacterial	strains	and	plasmids	used	in	this	study	
----	------	----	-----------	---------	-----	----------	------	----	------	-------	--

<sup>a</sup> Nal<sup>r</sup>, nalidixic acid resistant; Kan<sup>r</sup>, kanamycin resistant; Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistant; Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistant.

infection (28), while the *virB* operon encodes a type IV secretion system (TFSS) involved in the control of *Brucella*-containing vacuole maturation into a replication-permissive organelle (11).

In the current study, we investigated whether VjbR could mediate the  $C_{12}$ -HSL repressor effect. To achieve this objective, we used VjbR polypeptides mutated in the N-terminal AHL binding domain of the regulator. These mutant polypeptides behave as signal-independent regulators both in *B. melitensis* cultures and during cellular infection. Strains expressing these mutated regulators displayed a clumping phenotype that led us to investigate the role of VjbR in the regulation of cell surface components. Our data show that VjbR regulates exopolysaccharide (EPS) synthesis or export and also the production of several outer membrane proteins (Omps), some of which are involved in virulence.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Brucella* strains were grown with shaking at 37°C in 2YT medium (10% yeast extract, 10 g liter<sup>-1</sup> tryptone, 5 g liter<sup>-1</sup> NaCl) con-

taining appropriate antibiotics from an initial optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.05.

The *Escherichia coli* DH10B (Gibco BRL), S17-1 (60), and DB3.1 (Invitrogen) strains were grown in Luria-Bertani medium with appropriate antibiotics.

Chloramphenicol, nalidixic acid, and ampicilin were used at 20  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, and 100  $\mu$ g/ml, respectively. Synthetic C<sub>12</sub>-HSL from Fluka was prepared in acetonitrile (ACN) and was added to bacterial growth media at a final concentration of 5  $\mu$ M. The same volume of ACN was used for a negative control.

**Plasmid construction.** DNA manipulations were performed according to standard techniques (1). Restriction enzymes were purchased from Roche, and primers were purchased from Sigma-Aldrich.

Derivatives of the replicative plasmids pRH001 and pRH002 (34) harboring *vjbR* mutant alleles were constructed using the Gateway technique (Invitrogen). The destination vectors pRH001 and pRH002 harbor a chloramphenicol resistance (*cat*) marker and the toxic cassette *ccdB*. This group of genes is flanked by *attR1* and *attR2* recombination sites. The wild-type (wt) control allele corresponding to the total VjbR protein (amino acids 1 to 260) was amplified with primers VjbR-B1 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAT GAGTCTTGATCTCGTTCAT-3) and VjbR-B2 (5'-GGGGACAAGGTTGTA CAAAAAAGCAGGCTCGATGAA GGATGCAAATTCAGTTGCAAG-3') and VjbR-B2 were used for amplification of the predicted C-terminal DNA binding domain corresponding to amino acids 181 to 260 of VjbR [*vjbR*( $\Delta$ 1–180)]. *B. melitensis* 16M genomic DNA was used as the template for all amplifications.

Vol. 189, 2007

### MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6037

respectively) were cloned into pDONR201 (Invitrogen Life Technologies) by the BP reaction as described previously (21). The resulting entry clones pSB101 and pSB102 were confirmed by PCR using primers VjbR-B1 and VjbR-B2 and primers HTH-B1 and VjbR-B2. respectively.

Aspartate 82 of VjbR was mutated into alanine via PCR-based site-directed mutagenesis (QuikChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene), using pSB101 as the template. The resulting plasmid, pSB103, was sequenced to confirm the mutation using primers VjbR-B1 and VjbR-B2.

Entry clones containing *vjbR* alleles were used together with the destination vectors pRH001 and pRH002 during Gateway LR reactions as described previously (21). For quantification of the autoinducer response of VjbR mutants, the resulting vectors pSB201, pSB102, and pSB103 were transferred into the CD110 strain (*B. melitensis ΔvjbR*::Kan<sup>r</sup> containing a *PvirB-luxAB* transcriptional fusion) by mating. For a cellular infection experiment the resulting vectors pSB301, pSB302, and pSB303 were transferred into the CD100 strain (*B. melitensis ΔvjbR*::Kan<sup>r</sup>). For characterization of the clumping phenotype in *B. abortus*, the vectors pSB201, pSB202, and pSB203 were transferred into the RMD100 strain (*B. abortus ΔvjbR*::Kan<sup>r</sup>).

For construction of  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>t</sup> omp31::Cm<sup>t</sup>, an internal fragment of omp31 (BMEII0844) was initially amplified by PCR from *B. melitensis* 16M genomic DNA with primers F-Omp31 (5'-CTCGGCATTGCGGCTATTTTC-3') and R-Omp31 (5'-CAGGTTGAACGCAGATTT-3'). The R-Omp31 primer contains a TGA stop codon to avoid production of a functional truncated protein. The 341-bp amplified product was then inserted into the EcoRV-digested pSK-oriT cat vector in the opposite orientation relative to the *Plac* promoter to avoid expression of the 3' fragment of the disrupted coding sequences in *Brucella*. The construct was introduced into *B. melitensis* 16M (Nal<sup>t</sup>) from *E. coli* S17-1 by mating. A single crossover then led to disruption of the wt locus on the chromosome. Integrative mutants were selected on a medium containing kanamycin and nalidixic acid.

Plasmids used to assess mutated polypeptide stability were constructed using the Gateway technology with the pSB101 (pPlac-vjbR), pSB102 [pPlac-vjbR( $\Delta 1$ – 180)], and pSB103 [pPlac-vjbR(D82A)] entry clones and the pRH018 destination vector (34). The resulting plasmids pSB401, pSB402, and pSB403 allowed a C-terminal fusion of the regulator with the 13Myc tag.

The complementation plasmid carrying the *omp31* open reading frame under *Plac* control (pSB305) was constructed from pRH002 and pDONR-BMEII0844 from the ORFeome (21) using the Gateway technology.

**Mating.** Mating was performed by mixing equal volumes (100  $\mu$ l) of liquid cultures of *E. coli* S17-1 donor cells (OD<sub>600</sub> = 0.6) and the *B. melitensis* 16M Nal<sup>r</sup> recipient strain (overnight culture) on a 0.22- $\mu$ m-pore-size filter. The filter was left for 1 h on a 2YT medium plate without antibiotics and then transferred onto a 2YT medium plate containing chloramphenicol and nalidixic acid. After 3 days of incubation at 37°C, the exconjugates were replicated on a 2YT medium plate containing nalidixic acid and chloramphenicol.

**Measurement of luciferase activity.** Bacterial strains were grown overnight in 2YT medium with aeration at 37°C. Cultures were centrifuged, and the bacterial pellets were resuspended and washed twice in 2YT medium. For each strain, three 10-ml portions of cultures in 2YT medium (initial OD<sub>600</sub> of 0.05) were incubated at 37°C with shaking. After 20 h (*PvirB* expression peak) the OD<sub>600</sub> was measured, and 0.2-ml samples were harvested. *N*-decanal substrate was added to a final concentration of 0.145 mM (stock concentration, 5.8 mM in 50% ethanol). After 10 min, light production was measured for 5 s using a Microlumat LB96P luminometer (EG and Berthold). Luciferase activity was expressed in relative luminescence units per OD<sub>600</sub> unit at a given time point. Measurement was performed in triplicate.

**Cellular infections.** Survival of *Brucella* strains was evaluated in an immortalized cell line of bovine peritoneal macrophages (67) as described previously (15). A  $\Delta v j b R$  mutant was used as a negative control for replication defects during the cellular infection. C<sub>12</sub>-HSL was added at a final concentration of 5  $\mu$ M together with gentamicin. The same volume of ACN, the C<sub>12</sub>-HSL resuspension solvent, was used as a negative control.

Scanning electron microscopy. B. melitensis strains were grown overnight in 2YT medium with aeration at  $37^{\circ}$ C. For each strain three 1-ml portions of cultures in 2YT medium (initial  $OD_{600}$  of 0.05) were incubated at  $37^{\circ}$ C with shaking in a 24-well plate containing an insert plate with a porous membrane (diameter, 1.0 µm) (BD Falcon). After 24 h, brucellae were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde (PFA), and plates were centrifuged for 10 min at 1,000 rpm. Membranes were cut and dehydrated for 5 min in 25, 50, 75, 95, and 100% ethanol at room temperature. They were finally prepared by critical-point drying, mounted on an aluminum stub, and covered with a thin layer of gold (20 to 30 nm). Examination was carried out with a scanning electron microscope (XL-20;

Eindhoven, Philips, The Netherlands) at the Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique (University of Namur, Belgium).

**EPS staining.** Bacteria in a late-exponential-phase culture ( $OD_{600}$ , 1.0) were fixed with 4% PFA for 20 min before staining.

(i) Calcofluor white staining. For detection of polysaccharides, 1 ml of 0.05% calcofluor white (fluorescent whitener 28; Sigma) was added to 0.1 ml of PFA-fixed cells. Visualization was accomplished with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E1000) with the appropriate filter sets. Pictures were captured using a Hamamatsu ORCA-ER camera.

(ii) ConA-FITC staining. For confocal microscopy, 0.1 ml of concanavalin A (ConA)-fluorescein isothiocyanate (FITC) (1 mg/ml) was added to 0.2 ml of PFA-fixed cells. One microliter of propidium iodide (10 mM) was added for visualizing bacteria. After incubation for 30 min in the dark, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 8.5), resuspended in 100  $\mu$ l of the same buffer, and examined immediately using a Leica SP-1 confocal laser scanning microscope.

Dot blot analysis. Brucellae were grown for 48 h in 2YT medium at 37°C. Crude extracts were prepared as follows. After being washed in fresh 2YT medium, bacteria were concentrated 10-fold in PBS and inactivated for 1 h at 80°C. Equivalent amounts of proteins for each crude extract were used for serial twofold dilutions. Two microliters of each dilution was applied to a nitrocellulose membrane (Hybond; Amersham). Omp immunodetection was performed with the following monoclonal antibodies (MAbs) (10): anti-Omp25 MAb (A68/4B10/ F5) at 1/100, anti-Omp31 MAb (A59/10F9/G10) at 1/100, anti-Omp36 MAb (A68/25G5/A5) at 1/100, anti-Omp 89 MAb (A53/10B2) at 1/1,000, anti-Omp10 MAb (A68/7G11/C10) at 1/5, anti-Omp19 MAb (A68/25H10/A5) at 1/5, and anti-Omp16 (A68/08C03/G03) at 1/10. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies (Amersham) were used at 1/5,000 along with the ECL system (Amersham) to develop blots for chemoluminescence before visualization on film. Dot blots using MAbs specific for Omp16 (PAL lipoprotein) were used as internal loading controls. This protein did not show any change in the conditions tested. Dot blots were quantified using a PhosphorImager. The values used for the graph corresponded to the first dilutions at which differences between samples could be seen.

**Polymyxin B test.** Bacterial survival after controlled exposure to polymyxin B (7,870 U/mg; Sigma-Aldrich, Germany) was assayed essentially as described by Sola-Landa et al. (64). Briefly, serial dilutions of polymyxin B prepared in 1 mM HEPES (pH 8.0) were prepared in 96-well microtiter-type plates. Bacteria resuspended at  $2 \times 10^4$  CFU/ml were dispensed into triplicate rows, and plates were incubated for 1 h at 37°C. Viable bacteria were counted by spreading 20 µl from each well onto 2YT agar. The results were expressed as percentages of survival; 100% corresponded to the control incubated without the peptide.

ELLSA applied to culture supernatants. A peroxidase-labeled ConA solution stored at -20°C was diluted in PBS containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 diluting buffer to obtain a final concentration of 10 µg ml<sup>-1</sup>. One hundred microliters of the peroxidase-labeled lectin solution was added to wells previously coated for 16 h with 100-µl portions of supernatants of stationary-phase cultures vortexed for 1 min at full speed. At least three parallel experiments per sample dilution were run in each assay. Wells covered with PBS for the same contact time that was used for supernatants were subjected to the same treatment and used to estimate the nonspecific binding in the enzyme-linked lectin sorbent assay (ELLSA) response. Microtiter plates (Maxisorp; Nunc) were placed at room temperature for 1 h to allow the lectin to bind to the polysaccharides. The peroxidase-labeled lectin solution was removed from the wells by inverting the plates and tapping them on absorbent paper. Following five successive washes with 200 µl of diluting buffer to eliminate unbound enzyme conjugate, the linked peroxidase conjugate was visualized following addition of 100 µl of K-Blue as recommended by the manufacturer (Neogen). The reaction was allowed to develop for 15 min in the dark, and the absorbance at 650 nm and 450 nm was measured was a microplate reader.

Statistical analysis. Anova I was used for data analysis after the homogeneity of variance was tested (Barlett test). Average comparisons were performed by using pairwise Scheffe's test (55). The error bars in figures indicate the 95% confidence intervals of the means (computed from the residual mean square using Student's *t* test,  $\alpha = 0.05$ ).

### RESULTS

Negative effect of  $C_{12}$ -HSL on *PvirB* expression is mediated by VjbR. As previously described, the LuxR-type regulator VjbR and  $C_{12}$ -HSLs share common targets (14). VjbR is required for *virB* expression, and  $C_{12}$ -HSLs repress the transcrip-

### 6038 UZUREAU ET AL.





FIG. 1. Schematic representation of the VjbR mutated polypeptides. The pSB201-encoded wt VjbR polypeptide is shown at the top; the proposed autoinducer (AI) binding region is indicated by a solid bar, and the DNA binding region is indicated by a cross-hatched bar. Mutations in the VjbR polypeptide are indicated in the middle. The D82A substitution is indicated by an arrowhead, and conserved regions of deletants are represented. The relative levels of luciferase activity are indicated on the right. The values are expressed as percentages of the *PvirB* activity in the *B. melitensis* CD110 strain containing the pSB201 plasmid (top) grown without  $C_{12}$ -HSL. The average *PvirB* activity in the *vjbR* mutant was 40%. The values are the means of at least three experiments (the variation coefficients were between 1 and 8%).

tion from the virB promoter (PvirB). These observations led to the hypothesis that the C12-HSL repressor effect on the PvirB promoter could be linked to its inhibitory effect on the VjbR regulator. To test this hypothesis, we constructed two vjbRalleles mutated in the predicted AHL binding domain. The structure of TraR (the LuxR-type regulator of Agrobacterium tumefaciens) bound to its autoinducer led to prediction of several conserved amino acids directly involved in the binding of the pheromone (76, 82). These studies suggest that several hydrogen bonds, between the AHL and some conserved amino acids within the AHL binding hydrophobic pocket, are involved in the binding of the AHL. These residues are highly conserved in LuxR-type regulators (76, 82). One of them, Asp70, is conserved in VjbR (Asp82). Mutation of this amino acid has been described to inactivate the AHL binding to LuxR-type regulators (42, 57, 62). Consequently, we constructed the vjbR(D82A) allele encoding replacement of aspartate 82 with alanine. The  $vibR(\Delta 1-180)$  allele results in the complete deletion of the predicted autoinducer binding domain (14). wt as well as mutant alleles of vjbR were cloned under Plac control into the medium-copy-number plasmid pRH001 to generate pSB201 (pPlac-vjbR), pSB202 [pPlac $vjbR(\Delta 1-180)$ ], and pSB203 [pPlac-vjbR(D82A)] (Table 1). For the following experiments, the plasmids containing the wt vjbR, vjbR( $\Delta 1$ -180), and vjbR(D82A) alleles were designated pSBN01, pSBN02, and pSBN03, respectively.

To assess the effect of mutated VjbR regulators on PvirB activity, pSB201, pSB202, and pSB203 were introduced into CD110, a B. melitensis  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup> strain containing a PvirBluxAB transcriptional fusion as a reporter (Table 1). As shown in Fig. 1, the activity of PvirB-luxAB was reduced twofold in the presence of the wt vjbR allele and C12-HSL, analogous to the effect of this signal molecule in the wt strain. We were not able to detect any repression effect on PvirB upon addition of C12-HSL with the vjbR(D82A) or  $vjbR(\Delta 1-180)$  allele. Since both mutant regulators should be unable to bind C<sub>12</sub>-HSL, these results suggest that the LuxR-type regulator VjbR mediates the repression of PvirB by C12-HSL. As PvirB is insensitive to AHL repression in the presence of the vjbR(D82A) or  $vjbR(\Delta 1-180)$  allele, we propose that the VjbR polypeptides encoded by these alleles are defective in AHL binding and therefore behave like constitutive regulators.

VjbR mediates C12-HSL inhibitory effect on B. melitensis intracellular replication. Since C12-HSLs are known to repress PvirB expression in bacteriological cultures, we tested whether this is also the case during cellular infection. Bovine macrophages were infected with a wt B. melitensis strain in the presence or in the absence of C12-HSL. These signal molecules were added at the beginning of the infection at a final concentration of 5 µM. After 1 h and 48 h of infection the number of intracellular bacteria was evaluated. As shown in Table 2,  $C_{12}$ -HSL addition did not affect *B. melitensis* internalization (log CFU at 1 h postinfection) but strongly reduced its intracellular replication (log CFU at 48 h postinfection). Interestingly, this effect was not observed when C12-HSLs were added at 24 h postinfection (data not shown). These results suggest that perturbation of the QS network impaired intracellular replication or trafficking of the bacteria within macrophages.

To assess whether the effect of  $C_{12}$ -HSL during infection is also dependent on VjbR, bovine macrophages were infected in the presence or in the absence of  $C_{12}$ -HSL with strain CD100/ pSB301 (*B. melitensis*  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR) or CD100/ pSB303 [*B. melitensis*  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR(D82A)]. *B.* 

TABLE 2. Intracellular replication of B. melitensis in macrophages<sup>a</sup>

Stanla	Genetitei	Log (	CFU/well
Strain	Conditions	1 h postinfection	48 h postinfection <sup>b</sup>
wt	ACN C <sub>12</sub> -HSL	$\begin{array}{c} 3.19 \pm 0.01 \\ 3.28 \pm 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 5.00 \pm 0.12 \text{ A} \\ 3.60 \pm 0.23 \text{ A} \end{array}$
CD100	ACN C <sub>12</sub> -HSL	$\begin{array}{c} 3.26 \pm 0.11 \\ 3.07 \pm 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.92 \pm 0.07 \\ 2.96 \pm 0.09 \end{array}$
CD100/pSB301	ACN C <sub>12</sub> -HSL	$\begin{array}{c} 2.89 \pm 0.10 \\ 3.01 \pm 0.03 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.84 \pm 0.07 \\ 2.12 \pm 0.04 \ B \end{array}$
CD100/pSB303	ACN C <sub>12</sub> -HSL	$\begin{array}{c} 2.95 \pm 0.03 \\ 2.96 \pm 0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.82 \pm 0.04 \ B \\ 3.82 \pm 0.03 \end{array}$

 $^a$  Infections were performed in triplicate. At different time points, the cells were lysed and the numbers of intracellular bacteria were determined by plating the cell lysates on agar plates and expressed in log CFU per well  $\pm$  standard deviations. ACN is the C $_{12}$ -HSL solvent.

<sup>b</sup> Values followed by the same letter were significantly different (P < 0.001).

Vol. 189, 2007



FIG. 2. Observation of the clumping phenotype (left panels) and phasecontrast images of *B. melitensis* (right panels) in exponential growth phase. (A) *B. melitensis* 16M; (B) strain CD100/pSB203 harboring *vjbR*(D82A).

*melitensis* 16M and the CD100 vjbR defective strain were used as infection controls.

As shown in Table 2, addition of exogenous  $C_{12}$ -HSL to the CD100 (*B. melitensis*  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>) strain complemented with

### MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6039

the wt *vjbR* allele (CD100/pSB301) reduced the intracellular replication approximately 1.7 log, which is similar to the 1.4 log reduction observed with the wt strain. This repression effect was not observed with strain CD100/pSB303 expressing the mutated allele *vjbR*(D82A). These results suggest that VjbR mediates the effect of  $C_{12}$ -HSL on intracellular replication.

**B.** melitensis VjbR mutants display a clumping phenotype. Interestingly, the CD100 strain expressing the vjbR(D82A) or  $vjbR(\Delta 1-180)$  allele exhibits a striking phenotype. As the bacterial cultures reached a high density, cells aggregate and form clumps (Fig. 2).

This clumping phenotype was also observed with the CD100 (B. melitensis  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>) strain (clumps were smaller and generally observable only by microscopy), suggesting that various alterations of vjbR may result in this phenotype. This observation leads to the hypothesis that clumping repression in wt B. melitensis could be, via VjbR, under AHL control. Thus, a  $\Delta v i b R$  strain and a strain unresponsive to AHL both exhibit derepression of the clumping phenotype. In order to characterize this phenotype, we observed aggregates by scanning electron microscopy using culture samples collected at midexponential growth phase. As shown in Fig. 3, CD100 (B. melitensis  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>) and CD100/pSB203 [B. melitensis  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR(D82A)] differed greatly from the nonaggregating wt strain. While wt B. melitensis cells were isolated (Fig. 3A), vjbR mutant strains formed large aggregates in which bacteria appear to be embedded within a sticky matrix (Fig. 3B to D). Strain CD100/pSB202 [B. melitensis ΔvjbR::Kan<sup>r</sup>/  $pPlac-vjbR(\Delta 1-180)$ ] displayed a similar phenotype (data not



FIG. 3. Scanning electron micrographs of suspension cultures of *Brucella* strains. (A) wt *B. melitensis* strain 16M; (B and C) clumps formed by strain CD100; (D) clumps formed by strain CD100 harboring pSB203; (E) *B. abortus* 2308; (F) strain RMD100 harboring pSB203.

### 6040 UZUREAU ET AL.



FIG. 4. Identification of EPS(s) within aggregates formed by *Brucella vjbR* mutant strains. Phase-contrast images are shown in the left panels, and calcofluor white staining is shown in the right panels. (A) wt strain; (B) CD100 strain containing the vjbR(D82A) expression plasmid pSB203. Calcofluor white staining of the CD100/pSB202 strain gave similar results.

shown). To further characterize the clumping phenotype, we focused on the CD100/pSB203 strain as the clumping phenotype is more marked in this strain.

B. melitensis clumps contain EPSs. Extracellular matrixes are often composed of EPSs. To test whether EPSs are a major component of the matrix observed in the aggregating strains, culture samples were stained with calcofluor white, a general EPS dye. When calcofluor white was added to the samples, aggregates exhibited a bright fluorescence that was not observed with wt *B. melitensis* (Fig. 4). This positive staining indicates that bacteria are embedded in a matrix composed at least of a  $\beta$ -linked glucan EPS. We attempted to further characterize the EPS by using the ConA lectin, which is specific for  $\alpha$ -mannopyranosyl and  $\alpha$ -glucopyranosyl residues (47). Propidium iodide was used to counterstain bacteria red. As shown in Fig. 5, strain CD100 expressing *vjbR*(D82A) produced a matrix that stained green for ConA-FITC. Staining of the CD100 and CD100/pSB202 [*B. melitensis*  $\Delta vjbR$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR( $\Delta 1$ -180)] strains gave similar results (data not shown). These results demonstrate that *vjbR* mutant strains are able to produce EPS containing  $\alpha$ -mannopyranosyl and/or  $\alpha$ -glucopyranosyl residues as well as a β-linked glucan(s). This EPS is present in large amounts in the CD100/pSB202 [*B. melitensis*  $\Delta vjbR$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR( $\Delta 1$ -180)] and CD100/pSB203 [*B. melitensis*  $\Delta vjbR$ ::Kan<sup>r</sup>/pPlacvjbR(D82A)] strains and seems to be a component of the extracellular matrix of the aggregates.

VjbR-dependent clumping phenotype is not observed in *B. abortus* 2308. This study provided the first evidence of the ability of *B. melitensis* to produce an EPS. To identify genes involved in the synthesis of this polymer, we searched the *B. melitensis* genome for homologues of genes involved in EPS



FIG. 5. Interactions between FITC-labeled ConA lectin and aggregates formed by *Brucella vjbR* mutant visualized by confocal laser scanning microscopy. Culture samples of (A) *B. melitensis* strains 16M and (B) CD100 containing the vjbR(D82A) expression plasmid pSB203 were stained with ConA-FITC (green) and propidium iodide (red).

J. BACTERIOL.



FIG. 6. QS system of *B. melitensis* affects the production of several Omps. (A) Dot blot analysis of Omp amounts in the *B. melitensis* 16M wt strain cultivated with or without exogenous  $C_{12}$ -HSL. (B) Dot blot analysis of Omp amounts in the CD100 strain cultivated with or without exogenous  $C_{12}$ -HSL. (C) Densitometric quantification of Omps for dot blots in panels A and B. (D) Dot blot analysis of Omp amounts in the *B. melitensis* 16M wt strain and the CD100 strain complemented with pSB202. Cells were grown in 2YT medium and harvested in stationary phase. Whole-cell extracts were diluted as described in Materials and Methods, and dilutions were subjected to dot blot analysis using different Omp MAbs. ACN, negative control with the solvent (ACN) used for  $C_{12}$ -HSL dilution. The data are representative of three experiments.

MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6041

### 6042 UZUREAU ET AL.



FIG. 7. Effect of polymixin B on the viability of *B. melitensis* 16M, CD100, CD100/pSB202, and CD100/pSB203. The data for the wt and CD100 strains are superimposed on the graph. The graph is representative of three distinct experiments.

production in species closely related to Brucella that are able to produce EPS(s) (Agrobacterium tumefaciens, Sinorhizobium meliloti, etc.). Some of these homologues are located in a 25-kb locus that is absent in B. abortus (77). This observation led us to hypothesize that if at least one of these genes is required for the biosynthesis and/or export of EPS, B. abortus should not be able to form aggregates in conditions where B. melitensis does. In order to test this hypothesis, we constitutively expressed AHL-insensitive vjbR alleles described above in strain RMD100, a B. abortus 2308 strain deleted for vjbR (B. abortus VjbR shares 100% identity with B. melitensis VjbR). As illustrated in Fig. 3E and F, neither wt B. abortus 2308 nor the RMD100/pSB203 [B. abortus ΔvjbR::Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR(D82A)] strain displayed the typical clumping phenotype. These observations and the homology shared by the genes located in the 25-kb locus described above strongly suggest that one or several genes at this locus are required for EPS synthesis and/or export. Obviously, we cannot rule out the possibility that the absence of a clumping phenotype in B. abortus is due to other differences between B. melitensis and B. abortus.

Implication of QS in the regulation of surface properties in B. melitensis. VjbR was previously shown to regulate the TFSS VirB and flagella, two surface structures involved in B. melitensis virulence (14). Here we show that VjbR also has a role in the expression of a gene(s) involved in EPS synthesis and/or export. The common feature of the VjbR target genes is their involvement in surface composition. To assess whether other surface components of Brucella are regulated by QS through VjbR, the effect of C12-HSL addition on the abundance of six different Omps was tested by dot blot analysis using specific MAbs (10). Dot blotting was carried out with total *B. melitensis* extracts from stationary-phase cultures. The same amounts of proteins from all samples were used for dot blot analysis. As shown in Fig. 6A and C, the addition of exogenous C12-HSL led to a slight decrease in Omp10, Omp19, and Omp89 abundance, a strong increase in Omp25 and Omp31 abundance, and a slight increase in Omp36 abundance. To determine if VjbR mediates the effect of the pheromone on Omp production, the same experiment was performed with the vjbR-deficient strain CD100. We observed that in no case was the production of Omps affected by the addition of  $C_{12}$ -HSL (Fig. 6B and C). The effect of exogenous  $C_{12}$ -HSL is therefore VjbR dependent. As revealed by densitometric quantification (Fig. 6C), the effect of *vjbR* deletion is in agreement with this observation since the *vjbR*-deficient strain exhibited decreased production of Omps activated by  $C_{12}$ -HSL (Omp25, Omp36, and Omp31) and increased production of Omps repressed by  $C_{12}$ -HSL (Omp10, Omp19, and Omp89). These experiments suggest that VjbR is involved in the control of outer membrane composition. Whether this regulation is direct or indirect remains to be determined.

AHL-independent vjbR mutant strains display a pronounced surface phenotype. As suggested in this study, VjbR polypeptides mutated in the AHL-binding domain behave like constitutive regulators. We have shown that strains expressing these polypeptides display a clumping phenotype. It was therefore predicted that these strains would also exhibit modified outer membrane properties and probably exhibit modified sensitivity to cationic peptides like polymyxin B. To test this hypothesis, we compared the polymyxin B resistance of the B. melitensis 16M, CD100 (B. melitensis  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>), CD100/pSB201 (B. melitensis  $\Delta v j b R$ :: Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR), CD100/pSB202 [B. melitensis \DeltavjbR::Kan<sup>r</sup>/ pPlac-vjbR( $\Delta 1$ -180)], and CD100/pSB203 [B. melitensis  $\Delta v$ jbR:: Kan<sup>r</sup>/pPlac-vjbR(D82A)] strains (Fig. 7). B. melitensis is naturally resistant to polymyxin B (43). As shown in Fig. 7, the  $\Delta v j b R$ CD100 strain is not affected by this cationic polypeptide. Strains CD100/pSB201, CD100/pSB202, and pSB203 expressing wt and mutated vjbR alleles under Plac control display important sensitivity to polymyxin B, suggesting that the overexpression of any form of the VjbR regulator leads to membrane perturbations. We hypothesized that C12-HSL cannot act through VjbR in these strains, either because they express a mutated regulator or because the Plac-controlled overexpression of wt VjbR titrates the C12-HSL effect. To test whether the sensitivity to polymyxin B is correlated to deregulation of Omps, total extracts of CD100/pSB202 [B. melitensis ΔvjbR::  $\operatorname{Kan}^{r}/\operatorname{pPlac-vjbR}(\Delta 1-180)$ ] were subjected to Omp dot blot analysis. As shown in Fig. 6D, strain CD100/pSB202 overex-

J. BACTERIOL.



### MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6043



FIG. 8. Omp31 is implicated in the clumping phenotype and EPS production or export in *B. melitensis*. (A) Clumping phenotypes of the wt strain, *vjbR*-defective strain CD100, and *vjbR/omp31*-defective strain SB200 in 96-well 2YT medium cultures. (B) ELLSA with ConA-peroxidase and supernatants of shaken stationary-phase cultures of the wt, CD100, SB200, and SB200/pSB305 strains. Peroxidase activity is represented by the OD<sub>450</sub>-OD<sub>650</sub> value. Significant differences in relation to the wt strain are indicated by an asterisk (P < 0.05).

pressed all the Omps tested compared to the wt strain. These results suggest that the sensitivity to polymyxin B might be linked to the overproduction of Omps.

**Omp31 is implied in the clumping phenotype.** One of the Omps regulated by VjbR, Omp31, is encoded in the 25-kb DNA fragment absent in *B. abortus*. In their characterization of the 25-kb locus, Vizcaino et al. (77) suggested that Omp31 could be involved in the export of unknown polysaccharides, as shown for other bacterial Omps (3, 29, 70, 71). To test whether Omp31 is needed for the export of the *B. melitensis* EPS identified in this study, we constructed the  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup> *omp31*::Cm<sup>r</sup> strain SB200 and tested its clumping capacity in 96-well-plate cultures. As shown in Fig. 8A, the CD100 (*B. melitensis*  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>) strain exhibited large amounts of aggregates in rich bacterial medium, while the wt and SB200 ( $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup> *omp31*::Cm<sup>r</sup>) strains did not. These observations suggest that Omp31 is involved in the aggregation of v j b R mutant strains. To determine if this Omp is involved directly or

indirectly in EPS secretion, we used an ELLSA in which a ConA-peroxidase conjugate was incubated with coated stationary-phase culture supernatants. As shown Fig. 8B, the aggregating abilities of the wt, CD100 (*B. melitensis*  $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup>), and SB200 ( $\Delta v j b R$ ::Kan<sup>r</sup> omp31::Cm<sup>r</sup>) strains were correlated with ConA-peroxidase binding. These results were observed only when cultures were strongly vortexed before supernatants were harvested. EPS detection by ELLSA in strain SB200 was restored by complementation of the omp31 mutation by a plasmid copy of omp31 under the control of the Plac promoter (Fig. 8B). Our observations are in agreement with the proposed role (indirect or not) of Omp31 in EPS export.

### DISCUSSION

This investigation provided insights into the role of VjbR in AHL-mediated QS in *B. melitensis*. Evidence that VjbR mediates  $C_{12}$ -HSL effects and that this regulator is involved in Omp

84

regulation is described here. We also showed that it is implicated in the regulation of EPS production and/or export.

The VirB TFSS is crucial for the early steps of cellular infection. It reaches an expression peak at 5 h postinfection in B. abortus (60). As described in this study, exogenous C12-HSL represses B. melitensis replication within macrophages when it is added at the beginning of the infection. This inhibition is not observed in the CD100 vjbR-defective strain but is still effective in a babR (BMEI1758)-deficient strain (data not shown), underlying the specificity of VjbR-mediated QS during cellular infection. Addition of signal molecules at 24 h postinfection (data not shown) has no effect on B. melitensis replication, suggesting that if C12-HSLs are produced in vivo by B. melitensis, they could be produced later during the infection, possibly to repress virB when its presence is no longer required. The impairment of B. melitensis replication within macrophages in the presence of C12-HSL could be explained in part by early inactivation of the TFSS VirB. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that other virulence factors involved in the establishment of infection are regulated by C12-HSL.

We demonstrated that VjbR mediates the inhibitory effect of  $C_{12}$ -HSL on *PvirB* expression and intracellular replication using two mutated alleles of *vjbR*. These alleles encode polypeptides unresponsive to signal molecules, thus behaving as constitutive regulators. Our results are in agreement with earlier studies (9, 25, 68, 69) predicting the ability of VjbR Asp82, a highly conserved amino acid in LuxR regulators, to bind AHL.

Interestingly, strains producing the two mutant regulators showed even higher PvirB activity than a strain producing the wt regulator. Immunoblot analysis performed on crude extracts of B. melitensis strains carrying plasmids pSB401, pSB402, and pSB403 revealed that the different VjbR polypeptides tagged with the 13Myc tag were present at similar levels (data not shown). Thus, the effect of the VjbR mutant proteins on PvirB-luxAB is probably not due to their overproduction. We therefore propose that this phenomenon could be the result of the inability of these mutated regulators to mediate the repression effect of AHLs intrinsically produced by B. melitensis (73) that could also repress PvirB-luxAB fusion. Interestingly, Choi and Greenberg described a similar result with a  $\Delta 2$ -162 LuxR mutant (9). These authors suggested that the elevated activity could be explained by the fact that the Nterminal region of LuxR masks the activity of the C-terminal region of the regulator in the absence of autoinducer. However, this model is probably not applicable to VjbR, since the VjbR(D82A) polypeptide also shows greater activity than the wt polypeptide.

VjbR AHL-independent regulators always display exacerbated phenotypes compared to those of wt or CD100 strains (i.e., clumping phenotype, Omp production, and polymyxin B sensitivity). We hypothesize that this behavior could be attributed to the constitutive nature of the mutated regulators.

This investigation shows that mutations of the VjbR LuxRtype regulator lead to a clumping phenotype. The exacerbated clumping phenotype observed in VjbR-AHL-independent strains suggests that AHLs might repress aggregation. The failure of the *B. melitensis* wt strain to form aggregates in the conditions used in this study could be explained by this hypothesis since AHLs produced by *B. melitensis* may repress expression of genes involved in clumping.

Bacterial aggregation is one of the initial steps of biofilm formation; thus, the clumping phenotype described in this study suggests for the first time that *B. melitensis* could be able to form biofilms. Multicellular behavior in bacteria, including biofilm formation (35, 44), competence (39, 41, 49), or coordinated control of virulence factors (14, 65, 81, 83), is often controlled by QS. It is thus interesting that QS is related to aggregation in *B. melitensis*.

EPS is the major component of biofilm matrixes; consequently, we further characterized aggregates produced by AHL-independent strains. As revealed by calcofluor white staining and a lectin binding assay, aggregates formed by VjbR mutant strains contain an EPS(s) with  $\beta$ -glucan and  $\alpha$ -mannopyranosyl and/or  $\alpha$ -glucopyranosyl residues. The EPS is currently being characterized (M. Godefroid, unpublished data). The presence of EPS in aggregates is consistent with the hypothesis that the observed clumping phenotype is related to biofilm formation since EPSs are major components of biofilm matrixes (12). However, structures other than EPS, like flagella (36), Omps (4), adhesins (58, 59), or DNA (27, 66, 45, 79), could be involved in *B. melitensis* aggregation.

The absence of aggregation in *B. abortus* is most likely due to genomic differences from *B. melitensis*. We propose that one of the differences could be the deletion in the former organism of a large 25-kb fragment containing the *omp31* gene and other genes sharing homology with genes involved in EPS production in other species (*A. tumefaciens, S. meliloti, Rhizobium leguminosarum*, etc.). Our investigation suggests that Omp31 is involved in EPS production. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that other differences between these two strains are involved in this phenotype. The ability of some *Brucella* spp. strains to produce EPS could also contribute to the differences in host preference and disparate virulence of brucellae.

Our investigation demonstrates that other QS-induced surface modifications may occur, as revealed by the drastic modifications in Omp abundance upon C12-HSL addition. While some Omps are detected at a lower rate in the presence of signal molecules (Omp10, Omp16, and Omp19), others are present in greater abundance (Omp25, Omp31 and Omp36). Omp25 and Omp31 are the Omps most represented on outer membrane vesicles (OMV) produced by Brucella (2, 31, 32). This observation is particularly interesting, as Schooling and Beveridge have recently shown that OMV are common constituents of biofilm matrixes (56). These authors suggest that OMV might contribute to biofilm architectures and could be involved in the secretion of several molecules. It will be interesting to further characterize the matrix produced by B. melitensis and to assess the potential role of OMV in this multicellular behavior.

An important conclusion drawn from our investigation is that VjbR is implicated in the regulation of numerous membrane structures in *B. melitensis*. Besides the previously described role of VjbR in TFSS and flagellum regulation, we report here that it is implicated in the regulation of EPS synthesis and/or export and in outer membrane properties. No S-lipopolysaccharide differences have been revealed by Western blot analysis using S-lipopolysaccharide MAbs (data not Vol. 189, 2007

shown). Interestingly, numerous attenuated mutants of *B. melitensis* were previously shown to be altered in membrane composition, like mutants with mutations in the TFSS VirB (15, 48), flagella (28), Omp10 and Omp19 (74), Omp25 (22, 23, 24), and the BvrR/BvrS two-component system (64). BvrR/BvrS transpositional mutants show Omp25 and Omp3b under-production (33) and high susceptibility to polymyxin B (64). These observations led to the hypothesis that the BvrR/BvrS two-component system is involved in cell envelope changes required for adaptation to the intracellular environment. Here we describe a second system involved in outer membrane regulation.

We report for the first time evidence that B. melitensis could be able to form a biofilm. This aptitude could have several advantages in the host, including (i) protection against host defenses (18, 19, 52), (ii) adhesion to host cells and surfaces (5, 6), and (iii) protection against acidity (84), among others. Furthermore, biofilms have been shown to be implicated in several chronic infections, mediating persistence of pathogens despite host defenses or antibiotic treatments (13, 20). Brucellosis is a chronic infection, and the ability of B. melitensis to produce an EPS(s) demonstrated in this work could be a cause of the still unsolved persistence of this pathogen within the host. Besides, B. melitensis is able to survive for several weeks on inert surfaces (http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/fr/health/diseases-cards/ brucellosi-bo.html); thus, a possible role for the biofilm outside the host could be protection against desiccation, as described for Salmonella enterica serovar Typhimurium (80) and for Nostoc commune (72).

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C. Didembourg for helpful technical assistance, B. Nkengfac for relevant English corrections, and E. Depiereux for statistical analysis of our results. We are grateful to R. M. Delrue for the construction of plasmids pSB101 and pSB102 and for helpful discussions. We thank past and present members of the *Brucella* team of the URBM for fruitful discussions. We also thank the Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique and the Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (University of Namur, Belgium) for help with use of the scanning electron microscope and the confocal microscope, respectively.

This work was supported by the Commission of the European Communities (contract QLK2-CT-2002-00918). S. Uzureau, M. Godefroid, C. Deschamps, and J. Lemaire hold a specialization grant from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (FRIA).

### REFERENCES

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. E. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1991. Current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates, New York, NY.
- Boigegrain, R. A., I. Salhi, M. T. Alvarez-Martinez, J. Machold, Y. Fedon, M. Arpagaus, C. Weise, M. Rittig, and B. Rouot. 2004. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. Infect. Immun. 72:5693–5703.
- Bugert, P., and K. Geider. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. Mol. Microbiol. 15:917–933.
- Burdman, S., E. Jurkevitch, B. Schwartsburd, and Y. Okon. 1999. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum* brasilense. Microbiology 145:1145–1152.
- Castaneda-Roldan, E. I., F. Avelino-Flores, M. Dall'Agnol, E. Freer, L. Cedillo, J. Dornand, and J. A. Giron. 2004. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. Cell. Microbiol. 6:435–445.
- Castaneda-Roldan, E. I., S. Ouahrani-Bettache, Z. Saldana, F. Avelino, M. A. Rendon, J. Dornand, and J. A. Giron. 2006. Characterization of SP41,

### MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6045

a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. Cell. Microbiol. 8:1877–1887.

- Celli, J. 2006. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. Res. Microbiol. 157:93–98.
- Celli, J., and J. P. Gorvel. 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Microbiol. 7:93–97.
- Choi, S. H., and E. P. Greenberg. 1991. The C-terminal region of the Vibrio fischeri LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11115–11119.
- Cloeckaert, A., P. de Wergifosse, G. Dubray, and J. N. Limet. 1990. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. 58:3980–3987.
- Comerci, D. J., M. J. Martinez-Lorenzo, R. Sieira, J. P. Gorvel, and R. A. Ugalde. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. Cell. Microbiol. 3:159–168.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49:711–745.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284:1318–1322.
- Delrue, R. M., C. Deschamps, S. Leonard, C. Nijskens, I. Danese, J. M. Schaus, S. Bonnot, J. Ferooz, A. Tibor, X. De Bolle, and J. J. Letesson. 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. Cell. Microbiol. 7:1151–1161.
- Delrue, R. M., M. Martinez-Lorenzo, P. Lestrate, I. Danese, V. Bielarz, P. Mertens, X. De Bolle, A. Tibor, J. P. Gorvel, and J. J. Letesson. 2001. Identification of *Brucella spp.* genes involved in intracellular trafficking. Cell. Microbiol. 3:487–497.
- 16. DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides, and R. Overbeek. 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:443–448.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe, and N. F. Cheville. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect. Immun. 58:2320–2328.
- D'Haeze, W., J. Glushka, R. De Rycke, M. Holsters, and R. W. Carlson. 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. Mol. Microbiol. 52:485–500.
- D'Hacze, W., and M. Holsters. 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. Trends Microbiol. 12:555–561.
- Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15:167–193.
- 21. Dricot, A., J. F. Rual, P. Lamesch, N. Bertin, D. Dupuy, T. Hao, C. Lambert, R. Hallez, J. M. Delroisse, J. Vandenhaute, I. Lopez-Goni, I. Moriyon, J. M. Garcia-Lobo, F. J. Sangari, A. P. Macmillan, S. J. Cutler, A. M. Whatmore, S. Bozak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M. Vidal, D. E. Hill, J. J. Letesson, and X. De Bolle. 2004. Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. Genome Res. 14:2201–2206.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, N. J. Booth, W. T. Fulton, S. D. Hagius, J. V. Walker, and P. H. Elzer. 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. Am. J. Vet. Res. 62:1461–1466.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, and P. H. Elzer. 2002. Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against Brucella melitensis and Brucella ovis. Vet. Microbiol. 88:205–221.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, S. D. Hagius, L. E. Samartino, W. T. Fulton, J. V. Walker, F. M. Enright, N. J. Booth, and P. H. Elzer. 2002. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant. Res. Vet. Sci. 72:235–239.
- Egland, K. A., and E. P. Greenberg. 2000. Conversion of the Vibrio fischeri transcriptional activator, LuxR, to a repressor. J. Bacteriol. 182:805–811.
   Ficht, T. A. 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with
- Pickel, Y. A. 2005. Interchange survival of Directal: Comming the link with persistence. Vet. Microbiol. 92:213–223.
   Finkel, S. E., and R. Kolter. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial
- Finkel, S. E., and R. Kolter. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. J. Bacteriol. 183:6288–6293.
- Fretin, D., A. Fauconnier, S. Kohler, S. Halling, S. Leonard, C. Nijskens, J. Ferooz, P. Lestrate, R. M. Delrue, I. Danese, J. Vandenhaute, A. Tibor, X. DeBolle, and J. J. Letesson. 2005. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cell. Microbiol. 7:687–698.
- Frosch, M., D. Muller, K. Bousset, and A. Muller. 1992. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. Infect. Immun. 60:798–803.
- 30. Fuqua, W. C., and S. C. Winans. 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.

- Gamazo, C., and I. Moriyon. 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. Infect. Immun. 55:609– 615.
- 32. Gamazo, C., A. J. Winter, I. Moriyon, J. I. Riezu-Boj, J. M. Blasco, and R. Diaz. 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 57:1419–1426.
- 33. Guzman-Verri, C., L. Manterola, A. Sola-Landa, A. Parra, A. Cloeckaert, J. Garin, J. P. Gorvel, I. Moriyon, E. Moreno, and I. Lopez-Goni. 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:12375–12380.
- Hallez, R., J. J. Letesson, J. Vandenhaute, and X. De Bolle. 2007. Gatewaybased destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in *Brucella abortus*. Appl. Environ. Microbiol. 73:1375–1379.
- Hammer, B. K., and B. L. Bassler. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 50:101–104.
- Jeon, B., K. Itoh, N. Misawa, and S. Ryu. 2003. Effects of quorum sensing on flaA transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. Microbiol. Immunol. 47:833–839.
- Kaplan, H. B., and E. P. Greenberg. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. J. Bacteriol. 163:1210–1214.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. BioTechniques 16:800–802.
- Lee, M. S., and D. A. Morrison. 1999. Identification of a new regulator in Streptococcus pneumoniae linking quorum sensing to competence for genetic transformation. J. Bacteriol. 181:5004–5016.
- Letesson, J. J., and X. De Bolle. 2004. Brucella—molecular and cellular biology. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Luo, P., H. Li, and D. A. Morrison. 2003. ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneu*moniae. Mol. Microbiol. 50:623–633.
- Luo, Z. Q., A. J. Smyth, P. Gao, Y. Qin, and S. K. Farrand. 2003. Mutational analysis of TraR. Correlating function with molecular structure of a quorumsensing transcriptional activator. J. Biol. Chem. 278:13173–13182.
- Martinez de Tejada, G., J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, and I. Moriyon. 1995. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect. Immun. 63:3054–3061.
- McLean, R. J., M. Whiteley, D. J. Stickler, and W. C. Fuqua. 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 154:259–263.
- Molin, S., and T. Tolker-Nielsen. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr. Opin. Biotechnol. 14:255–261.
   Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch, and H.
- Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch, and H. Mayer. 1990. Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J. Bacteriol. 172:3569–3576.
- Naismith, J. H., and R. A. Field. 1996. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. J. Biol. Chem. 271:972–976.
- 48. O'Callaghan, D., C. Cazevieille, A. Allardet-Servent, M. L. Boschiroli, G. Bourg, V. Foulongne, P. Frutos, Y. Kulakov, and M. Ramuz. 1999. A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. Mol. Microbiol. 33:1210–1220.
- Pestova, E. V., L. S. Havarstein, and D. A. Morrison. 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. Mol. Microbiol. 21:853–862.
- Pirhonen, M., D. Flego, R. Heikinheimo, and E. T. Palva. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. EMBO J. 12:2467–2476.
- Pizarro-Cerda, J., S. Meresse, R. G. Parton, G. van der Goot, A. Sola-Landa, I. Lopez-Goni, E. Moreno, and J. P. Gorvel. 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. 66:5711–5724.
- Reckseidler-Zenteno, S. L., R. DeVinney, and D. E. Woods. 2005. The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition. Infect. Immun. 73: 1106–1115.
- Redfield, R. J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends Microbiol. 10:365–370.
- Sangari, F., and J. Aguero. 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. Microb. Pathog. 11:443– 446.

- Scheffé, H. 1959. The analysis of variance. John Wiley and Sons, New York, NY.
  Schooling, S. R., and T. J. Beveridge. 2006. Membrane vesicles: an over-
- looked component of the matrices of biofilms. J. Bacteriol. **188**:5945– 5957.
- Shadel, G. S., R. Young, and T. O. Baldwin. 1990. Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. J. Bacteriol. 172:3980–3987.
- Sherlock, O., M. A. Schembri, A. Reisner, and P. Klemm. 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. J. Bacteriol. 186:8058–8065.
- Sherlock, O., R. M. Vejborg, and P. Klemm. 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. Infect. Immun. 73:1954–1963.
- Sieira, R., D. J. Comerci, L. I. Pietrasanta, and R. A. Ugalde. 2004. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. Mol. Microbiol. 54:808–822.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology 1:783–791.
- Slock, J., D. VanRiet, D. Kolibachuk, and E. P. Greenberg. 1990. Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. J. Bacteriol. 172:3974–3979.
- Smith, L. D., and T. A. Ficht. 1990. Pathogenesis of *Brucella*. Crit. Rev. Microbiol. 17:209–230.
- 64. Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, M. J. Grillo, E. Moreno, I. Moriyon, J. M. Blasco, J. P. Gorvel, and I. Lopez-Goni. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Mol. Microbiol. 29:125–138.
- Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15196–15201.
- Spoering, A. L., and M. S. Gilmore. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 9:133–137.
- Stabel, J. R., and T. J. Stabel. 1995. Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. Vet. Immunol. Immunopathol. 45:211–220.
- Stevens, A. M., and E. P. Greenberg. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. J. Bacteriol. 179:557–562.
- Stevens, A. M., K. M. Dolan, and E. P. Greenberg. 1994. Synergistic binding of the Vibrio fischeri LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12619–12623.
- Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs, and P. R. Reeves. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. J. Bacteriol. 178:4885–4893.
- Stevenson, G., R. Lan, and P. R. Reeves. 2000. The colanic acid gene cluster of *Salmonella enterica* has a complex history. FEMS Microbiol. Lett. 191: 11–16.
- Tamaru, Y., Y. Takani, T. Yoshida, and T. Sakamoto. 2005. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7327–7333.
- Taminiau, B., M. Daykin, S. Swift, M. L. Boschiroli, A. Tibor, P. Lestrate, X. De Bolle, D. O'Callaghan, P. Williams, and J. J. Letesson. 2002. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 70:3004–3011.
- 74. Tibor, A., V. Wansard, V. Bielartz, R. M. Delrue, I. Danese, P. Michel, K. Walravens, J. Godfroid, and J. J. Letesson. 2002. Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. Infect. Immun. 70:5540–5546.
- Ulrich, R. L., D. Deshazer, H. B. Hines, and J. A. Jeddeloh. 2004. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. Infect. Immun. 72:6589–6596.
- Vannini, A., C. Volpari, C. Gargioli, E. Muraglia, R. Cortese, R. De Francesco, P. Neddermann, and S. D. Marco. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. EMBO J. 21:4393–4401.
- Vizcaino, N., A. Cloeckaert, M. S. Zygmunt, and L. Fernandez-Lago. 2001. Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. Infect. Immun. 69:6738–6748.
- von Bodman, S. B., D. R. Majerczak, and D. L. Coplin. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7687– 7692.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295: 1487.

J. BACTERIOL.

Vol. 189, 2007

- 80. White, A. P., D. L. Gibson, W. Kim, W. W. Kay, and M. G. Surette. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. J. Bacteriol. **188**:3219–3227.
- 81. Whiteley, M., K. M. Lee, and E. P. Greenberg. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad.
- Sci. USA 96:13004–13009.
  Zhang, R. G., T. Pappas, J. L. Brace, P. C. Miller, T. Oulmassov, J. M. Molyneaux, J. C. Anderson, J. K. Bashkin, S. C. Winans, and A. Joachimiak.

#### MUTATIONS OF QS-DEPENDENT REGULATOR VjbR 6047

- Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. Nature 417:971–974.
  Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos. 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expres-value of the sensing regulators control virulence gene expression in Vibrio cholerae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:3129-3134.
- 84. Zhu, M., S. Takenaka, M. Sato, and E. Hoshino. 2001. Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol. Immunol. 16:24-27.

### III.1.2 Informations complémentaires

# *III.1.2.1 Expression du domaine de liaison aux AHLs de VjbR dans la souche* B. melitensis *sauvage*.

Afin de conforter les résultats obtenus avec les allèles codant pour des régulateurs VjbR mutés dans leur domaine N-terminal de liaison aux AHLs présentés dans la première partie de ce chapitre, nous avons construit un troisième allèle codant pour le domaine de liaison aux AHLs seul (résidus 1 à 176). Cet allèle a été amplifié grâce aux amorces VjbR-B1 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAGTCTTGATCTCGTTCAT-3) et VjbR ABD-B2 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTACGAGGCTACGCAGCCGCAGACAGTTCCA T-3') puis cloné sous la dépendance du p*lac* dans le plasmide gateway medium copy pRH001 (dérivé du plasmide pMR10, Hallez R, 2006) par la technique Gateway. Le plasmide d'expression pSB204 ainsi obtenu a été inséré par transfert conjugatif dans la souche *B. melitensis* sauvage. Si, comme nous le proposons VjbR est capable de lier la  $C_{12}$ -HSL, l'expression du domaine de liaison aux AHLs de VjbR dans la souche sauvage doit être capable de titrer, au moins partiellement, l'effet de la  $C_{12}$ -HSL sur l'expression de l'opéron *virB*. Afin de confirmer cette hypothèse, le plasmide pSB204 a été introduit par conjugaison dans la souche *B. melitensis* 16M possédant le plasmide rapporteur pJD27-p*virB-luxAB*.

Le suivi de l'expression de pvirB-luxAB nous a permis de déterminer le pourcentage de répression de l'opéron virB par la  $C_{12}$ -HSL dans la wt possédant le plasmide contrôle pMR10 et dans la wt portant le plasmide pSB204. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure supplémentaire 1.



**Figure supplémentaire 1 :** Titration de l'effet de la  $C_{12}$ -HSL sur l'opéron *virB* par le domaine de liaison aux AHLs de VjbR. La titration des AHLs a été estimée par mesure du pourcentage de répression de l'opéron *virB* par la  $C_{12}$ -HSL grâce au suivi de la fusion *pvirB-luxAB*. Les bactéries ont été cultivées en milieu riche 2YT jusqu'en phase stationnaire, en présence d'acétonitrile (solvant de la  $C_{12}$ -HSL) ou de  $C_{12}$ -HSL 5  $\mu$ M. Le pourcentage de répression a été calculé de la façon suivante: (Activité de *pvirB-luxAB* en présence de  $C_{12}$ -HSL/ Activité *pvirB-luxAB* en absence de  $C_{12}$ -HSL) x 100. Ce graphe représente un exemple représentatif de 3 expériences indépendantes.

Une baisse importante de l'effet répresseur de la  $C_{12}$ -HSL apparait dans la souche wt pSB204 par rapport à la souche wt pMR10. Bien que la titration observée ne soit que partielle, cette observation confirme la capacité du domaine N-terminal de VjbR à lier la  $C_{12}$ -HSL. L'utilisation d'un plasmide high copy aurait peut être permis une plus forte titration des molécules signal, mais ceux disponibles ne sont pas compatibles avec le plasmide rapporteur pJD27-pvirB-luxAB.

## III.1.2.2 Modèle de régulation du phénotype d'agrégation

Lors de cette première partie du travail, nous avons mis en évidence que les souches produisant des variants de VjbR mutés dans leur domaine de liaison aux AHLs (mutation totale ou ponctuelle) présentent un phénotype d'agrégation en culture liquide. Ce phénotype semble lié à la production d'un ou plusieurs exopolysaccharide(s) actuellement en cours de caractérisation au laboratoire (Marie Godefroid, thèse en cours). Cependant l'observation du même phénotype dans la souche CD100 ( $\Delta v j b R$ ) semble contre-intuitive. C'est pourquoi nous proposons le modèle présenté dans la figure supplémentaire 2.



Figure supplémentaire 2 : Modèle de régulation du phénotype d'agrégation par VjbR et les AHLs.

La présence du phénotype d'agrégation dans la souche CD100 suggère que VjbR serait impliqué dans la répression (directe ou indirecte) de la production et/ou de l'export d'exopolysaccharide. Nous proposons que la  $C_{12}$ -HSL serait responsable, *via* VjbR, de la répression de ce phénotype dans la souche sauvage. Dans ce cas, la délétion du gène *vjbR* ainsi que la mutation du domaine de liaison aux AHLs de ce régulateur conduiraient toute deux à la levée de l'inhibition de la production et/ou de l'export de l'exopolysaccharide et donc de l'agrégation.

La mise en évidence des gènes impliqués dans le phénotype d'agrégation et l'étude de l'expression de leur promoteurs dans la souche sauvage et dans la souche  $\Delta v j b R$  en présence et en absence de C<sub>12</sub>-HSL permettrait de valider ce modèle.

# **III.2** Recherche de cibles directes et indirectes de VjbR : transcriptomique, protéomique et ChIP.

Lors de la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence l'implication du régulateur VjbR dans le contrôle de la production de plusieurs OMPs et dans celui de la synthèse ou l'export d'exopolysaccharide(s). Afin d'obtenir une image plus globale du rôle de ce régulateur chez *B. melitensis*, nous avons caractérisé le transcriptome et le protéome de la souche  $\Delta v j b R$  et évalué son comportement métabolique. La même approche a été utilisée en parallèle sur la souche  $\Delta b a b R$ . D'autre part, la technique d'immunoprécipitation chromatinienne a été utilisée afin de mettre en évidence des cibles directes de VjbR.

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en cours de préparation.

### **Participation des auteurs :**

Julien Lemaire et Sophie Uzureau ont réalisé l'étude transcriptomique. L'analyse statistique des données a été réalisée par Anthoula Gaigneaux. L'analyse protéomique a été effectuée par Sophie Uzureau et Julien Lemaire en collaboration avec Edouard Delaive (2D-DIGE) et Marc Dieu (LC-MS/MS). Les galeries métaboliques et les qRT-PCR ont été réalisées par Julien Lemaire et Sophie Uzureau. Julien Lemaire a effectué les tests de résistance au stress. Sophie Uzureau a réalisé les expériences de ChIP et a rédigé le manuscrit. Jean-Jacques Letesson et Xavier De Bolle et Martine Raes ont supervisé ce travail.

## The Quorum connection : global transcriptomic and proteomic analysis in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*

Sophie Uzureau<sup>1#</sup>, Julien Lemaire<sup>1#</sup>, Edouard Delaive<sup>2</sup>, Marc Dieu<sup>2</sup>, Anthoula Gaigneaux<sup>1</sup>, Martine Raes<sup>2</sup>, Xavier De Bolle<sup>1</sup> and Jean-Jacques Letesson<sup>1\*</sup>.

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium<sup>1</sup>. Unité de Recherche en Biologie Cellulaire, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium<sup>2</sup>.

<sup>#</sup>Both authors contributed equally to this work. \* Corresponding author. Mailing adress : Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium

Maning auress : Facultes Universitaires Noue-Danie de la Faix, Naniur, Belgium

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, rue de Bruxelles 61, 5000-Namur, Belgium.

Phone : (32) 81 72 44 02

Fax : (32) 81 72 42 97

E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be

## Abstract

Many pathogenic bacteria use a regulatory process termed Quorum Sensing (QS) to produce and detect small diffusible molecules to synchronize gene expression within a population. In Gramnegative bacteria, the detection and response to these molecules depend on transcriptional regulators belonging to the LuxR family. Such a system has been discovered in the intracellular pathogen Brucella melitensis, a Gram-negative bacterium responsible for brucellosis, a world-wide zoonosis remaining a serious public health concern in countries were the disease is endemic. Two LuxR-type regulators, VjbR and BabR, have been identified in the genome of this pathogen. The  $\Delta v j b R$  mutant is highly attenuated in all tested models suggesting a crucial role of QS in the virulence of *Brucella*. This attenuation is at least due to the involvement of VjbR in the activation of the virB operon coding for a type four secretion system essential for Brucella to reach its intracellular replication compartment. At present, no function has been attributed to BabR. To assess the role of both *Brucella* QS-regulators, we performed in tandem comparative transcriptomic and proteomic analyses of  $v_{jb}R$  and babR mutants. These experiments revealed that 10% of *Brucella* genome is regulated through those regulators, revealing that QS is a global regulatory system in this intracellular pathogen. The overlap between BabR and VjbR targets suggest an crosstalk between these two regulators. Moreover, our results demonstrate that VjbR and BabR regulate many gene and/or proteins involved in stress response, metabolism and virulence. These targets are potentially involved in the adaptation of *Brucella* to the oxidative, pH and nutritional stresses encountered within the host. These findings highlight the involvement of QS in the virulence of Brucella and led us to suggest that this regulatory system could be implied in the spatial and sequential adaptation of Brucella to the host environment.

## Introduction

Bacteria of the genus *Brucella* are the etiological agent of brucellosis, the most widespread zoonotic disease worldwide, resulting in more than 500 000 new cases per year [1]. Animal brucellosis is a disease affecting wild and domestic animals, causing abortion and sterility in cattle and triggering huge economical losses [2]. Of the six species constituting the *Brucella* genus, four *Brucellae* species can infect humans, causing a chronic, debilitating disease with severe and sometimes fatal outcomes. As a result, brucellosis represents a significant public health concern in endemic countries (predominantly in the Mediterranean region and areas of Asia, Africa and Latin America) [3,1].

Brucella spp. are Gram-negative intracellular pathogens belonging to the  $\alpha$ -2 proteobacteria group. The virulence of *Brucellae* is based on their aptitude to infect professional and non-professional phagocytes. These pathogens are remarkably well adapted to the intracellular lifestyle and their capacity to survive and to multiply in these host cells is the basis for the development and the chronicity of brucellosis. During host cell infection, *Brucella* is able to redirect vacuolar trafficking, avoid the fusion of their membrane-bound compartment with lysosomes and create a replication-permissive organelle which will allow their multiplication. Conversely to other pathogenic bacteria, no traditional virulence factors have been described in the sequenced genomes of *Brucellae* [4-7]. Instead, virulence strategies of these pathogens rather seem to be based on poor stimulatory activity and toxicity for cells [8], resistance to intracellular killing [4], adaptation to the intracellular milieu [9-11] and creation of the replication-permissive compartment in professional and non-professional phagocytes [12-15].

During infection *Brucella* is confronted to very diverse environments and host defence mechanisms. Thus completion of a successful infection cycle is crucially dependent of a fine tuning of gene expression according to environmental stimuli. Among the systems allowing such regulations, Quorum Sensing (QS) is of particular interest because of its known involvement in the virulence of *Brucella* [16] and other pathogens [17-20]. QS is a communication system used by a large number of bacteria to synchronize gene expression within a population. This system involves the synthesis, release and subsequent detection of small diffusible molecules called autoinducers (commonly *N*-acyl-homoserine lactones or AHLs in Gram-negative bacteria). When AHLs concentration reaches a threshold level, they bind to LuxR-type transcriptional regulators and modify their activity. While QS has been discovered in *V. fischeri* in the early 1970s [21], the conceptual role of this communication system has considerably evolved. QS was first described as a system allowing bacteria to sense population density [22]. However the autoinducers concentration can be affected by numerous parameters like diffusion, spatial distribution, and degradation [23-24].

Two LuxR-type regulators were identified in the *B. melitensis* genome [5], the previously described VjbR regulator [16,25] and BabR [26]. While the virulence of the  $\Delta vjbR$  strain is highly attenuated in all tested models, *babR* doesn't seems to be involved in *B. melitensis* virulence in the conditions tested [26]. Despite the lack of a classical AHL synthase in the genome of *B. melitensis*, we have previously identified C<sub>12</sub>-HSL from *B. melitensis* culture supernatants [27]. This autoinducer down regulates the expression of flagellar genes [16], and of the *virB* operon encoding a type IV secretion system [27], two virulence factors involved in the establishment of chronic infection [28] and the control of *Brucella* containing vacuole (BCV) maturation respectively [29]. VjbR was identified as a transcriptional activator of these genes and mediates the effect of C<sub>12</sub>-HSL on *virB* transcription [25]. Moreover it was recently demonstrated that VjbR is involved in the regulation of exopolysaccharide synthesis and/or export and the production of several outer membrane proteins

In the attempt to define the role of QS in *B. melitensis*, we characterize the two QS mutants  $\Delta babR$  and  $\Delta v j bR$  using several complementary approaches (microarray analysis, 2D-DIGE, substrate assimilation test, stress response...). Our results demonstrate that in bacterial broth, 10% of the *B. melitensis* genome is regulated via QS (9% through VjbR and 1% through BabR), thus revealing that QS is a global regulation system in this intracellular pathogen. Interestingly many genes regulated by BabR are also regulated by VjbR, suggesting a cross-talk between these two regulators. Another important observation drawn from this study is the involvement of VjbR and BabR in the regulation of genes and proteins involved in stress response, various metabolic pathways and virulence. Due to these findings, we can speculate that *B. melitensis* QS system may play a fine-tuning role in the spatial and chronologic adaptation of the bacteria during the infectious process. In this context, the communication system of *Brucella* could be used inside the host cell and should then rather be termed "Efficiency Sensing" in agreement with the definition of Hense and co-workers taking into account diffusion and spatial distribution of signal molecules [24].

## Results

## **Transcriptome analysis of Brucella QS mutants**

## Expression profiles of the VjbR defective strain

As previously described, the LuxR-type regulator VjbR is involved in the regulation of several virulence factors required at different steps of the infection. In order to draw a global image of the regulon, we performed a microarray analysis comparing the *B. melitensis* wt and the *B. melitensis*  $\Delta v j b R$  expression profiles. Knowing that VjbR and several virulence factors are produced during mid-exponential growth phase, total RNA was extracted in these conditions. RNA samples were hybridized to *B. melitensis* DNA microarray (Nimblegen). The gene expression pattern of the  $\Delta v j b R$  strain was compared to profiles generated from the wt strain. This analysis reveals that 296 genes are differentially expressed in the v j b R mutant strain, demonstrating that 9.2% of the genome represent direct and indirect VjbR targets (Table S1). This observation reveals a global role of VjbR-dependant QS in *B. melitensis* gene regulation. Conversely to what was expected from previous experiments on *PvirB* and *PfliF* expression profiles [16,27], VjbR behaves essentially as a repressor, since 74.6% (221 ORFs) of its predicted targets are over-expressed in the mutant strain. Analysis of the distribution of VjbR target genes on the two chromosomes of *B. melitensis* does not reveal the presence of "hot spots" of regulation (Figure S1). Several known VjbR-regulated genes were found, like *virB* and OMPs genes, thus providing validation for the use of microarrays.

## Functional classes regulated by VjbR

To further characterize the role of VjbR, we compared the repartition in predicted functional classes (KEGG annotations) of VjbR regulated ORFs to the repartition of the whole ORFs of *B. melitensis*. Similarly to what was described for other bacteria like *Escherichia coli* [30] and *Pseudomonas aeruginosa* [31], our analysis reveals that the expression of numerous genes involved in basic cellular processes is regulated through QS. As illustrated in Figure 1, VjbR targets are over-represented in several functional classes like "folding, sorting and degradation", "translation", "membrane transport" and "energy metabolism".

VjbR targets listed in the first category are essentially involved in protein export (Type IV and Sec secretion systems), protein folding (*groES*, *groEL*, *hspA*, *cspA* are activated by VjbR) and thioldisulfide exchange (*dsbA*, *dsbB*, BMEI1129 and BMEI2022 encoding respectively a glutaredoxin and a thioredoxin are repressed by VjbR). These observations corroborate the implication of VjbR in the regulation of type IV secretion and suggest that this regulator has a broader role in protein processing. Numerous genes coding for ribosomal proteins and translation factors are repressed by VjbR suggesting that this regulator could slow down the translation process and consequently bacterial growth. Genes coding for membrane transport represent 18.2% of VjbR targets. The expression of many amino acids, sugars and oligopeptides transport systems is repressed by VjbR although this regulator also activates the expression of limited number of genes involved in the transport of the same type of compounds.

In the same way, VjbR represses the expression of genes coding for components of the cytochrome *bc1* complex, cytochrome *c* oxidase *caa3* (*coxA*, *coxB*, *coxC*) and *cbb3* (*ccoN*, *ccoO*) and activates genes coding for components of ubiquinol oxidase *o* (*cyoA*, *cyoB*, *cyoC*, *cyoD*) and ubiquinol oxidase *bd* (*cydA*). The oxidase *cbb3* is dependent on the cytochrome *bc1* complex unlike ubiquinol oxidase *o* and *bd*. The two high-oxygen-affinity terminal oxidases [32] cytochrome *cbb3* and cytochrome *bd* are differentially expressed *in vivo* and *ex vitro*.



**Figure 1** : Predicted function of *Brucella* ORFs. A : whole genome ORFs predicted functions, B : predicted functions of VjbR targets, C : predicated functions of BabR targets. The functions were assigned according to KEGG categories. "Unassigned" means that the predicted function of the ORF cannot be classified in the other categories.

Indeed cytochrome cbb3 is specifically expressed *in vitro* under microaerobiosis, while the ubiquinol oxidase *bd* is preferentially expressed within macrophages and participates to the intracellular survival of *B. suis* [33]. It was thus proposed that ubiquinol oxidase *bd* have an higher oxygen affinity and allow bacteria to adapt to the low oxygen tensions encountered within macrophages [10, 33].

## Expression profiles of the BabR defective strain

Since no BabR targets have been identified, we also wanted to determine the potential role of this QS-related regulator. Total RNA from the  $\Delta babR$  strain was extracted and processed as described above for wt and  $\Delta v j b R$  strains. The gene expression pattern of the  $\Delta babR$  strain was compared to profiles generated from the wt strain and revealed that BabR regulates the expression of 42 ORFs (1.3% of the genome). Among those targets, 38 genes are repressed through BabR, revealing that this regulator also mainly acts as a transcriptional repressor.

As shown in Figure 1, many BabR targets belongs to the "folding, sorting and degradation" functional class. BabR represses the 14 genes classified in this functional group. This includes 7 *virB* genes, *clpP*, *clpA*, and genes coding for the chaperones GroES, GroEL and DnaK, a protein identified as necessary for *B. suis* survival in macrophages [34].

## Predicted localization of QS targets

The differences between the predicted localizations of proteins encoded by the putative transcriptional targets of VjbR and BabR and of the whole proteins encoded by the genome of *B. melitensis* is highly significant (Table 1). Indeed we observed that 33 % of VjbR repressed target genes encode membrane proteins, with a higher outer membrane location ratio than for the whole genome encoded proteins. VjbR and BabR also significantly regulate a high proportion of periplasmic proteins, essentially periplasmic binding proteins of ABC transporters (for further details, see Table S1). This observation is in agreement with a recent study [25] and strengthen the role of VjbR in enveloppe regulation in *B. melitensis*.

	Whole genome	Activated by VjbR	Repressed by VjbR	Activated by BabR	Repressed by BabR
Periplasmic Cytosolic Secreted/Fibria/Pili Membrane	6.3 % 70.5% 0.7% 22.5 %	* { 13% 65% 0% 22%	** {	** { 25% 50% 25% 0%	** {
OM associated Integral OM IM associated integral IM	1.3 % 5.3 % 7.6 % 85.8 %	** { 2.1 % 20.8 % 4.2 % 72.9 %	** {	** { 0% 0% 0% 0%	** { 0% 9.4 % 18.7 % 71.9 %

**Table 1** : Predicted localization of proteins encoded by the whole genome of *B. melitensis* and by QS target genes. A Chi-square statistical test was applied to compare the repartition between whole genome encoded proteins and QS mutant targets for periplasmic/cytosolic/secreted/fimbriae/pili/membrane localisation and for membranous localisation,\* means significant (x=0.05) \*\* means highly significant (x=0.01). OM : Outer Membrane, IM : Inner Membrane.

## Connections between the two Brucella QS-regulators

An interesting observation made from this all genome transcriptomic comparative analysis is that 64.3% (27 ORFs) of the BabR transcriptional targets are also regulated by VjbR (Table 2). The two regulators act in an opposite way on 60% of those genes, including *virB* genes, chaperones and transporters. Up to now, no positive effect of VjbR and BabR on their own promoter has been

	Cellular function	Target	Protein	ratio <i>∆vjbR /</i> wt	ratio <i>∆babR /</i> wt	Predicted localization
Coregulated Targets						
	Amino Acid metabolism					
		BMEI2029	Adenosylhomocysteinase	1,74	1,47	С
	Biodegradation of xenobiotics					
		BMEI1747	Aldehyde Dehydrogenase	2,37	1,98	С
	Cell Growth and death					
		BMEI0343	Cell Division Protein FtsH	1,31	1,41	IIM
	Hypothetical					
		BMEI0369	Hypothetical Protein	1,36	1,32	Р
		BMEI1479	Hypothetical Protein	2,15	1,46	C
		BMEI1866	Hypothetical Protein	1,48	1,31	С
	Membrane transport	DMEMON	05 LDs O the Marshare Income and Bratein Branner	0.04	4.40	1014
		BMEI1249	25 KDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,34	1,40	IOM
	Translation	BMEII0783	Na(+)-Linked D-Alanine Glycine Permease	1,50	1,50	IIIVI
	Translation		SSU Dihagamal Protain SSD	2.00	1.25	C
	Transprintion	DIVIET1400		2,09	1,35	C
	Папосприон	BMEI1364	Transcriptional Regulatory Protein MucR	1.51	1 30	C
Diferentially regulated Targets	Aurice Arid metabolism				.,	-
	Amino Acid metabolism	DME10210	Malanata Camialdahuda Dahudraganaga (Agulating)	2.07	0.67	C
	Folding, sorting and degradation	DIVIEIU219	Inalonate-Semialdenyde Denydrogenase (Acylating)	5,27	0,67	U
		BMEII0025 BMEII0026 BMEII0027 BMEII0028 BMEII0029 BMEII0032 BMEII1047 BMEII1048	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog Attachment Mediating Protein VirB2 Homolog Channel Protein VirB3 Homolog ATPase VirB4 Homolog Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog Channel Protein VirB8 Homolog 10 kDa Chaperonin GroES 60 kDa Chaperonin GroEL	0,15 0,11 0,15 0,33 0,26 0,50 0,49 0,35	1,44 1,57 1,56 1,56 1,37 1,55 2,95 3,19	P IIM C P C C C
	Hypothetical					
		BMEII0516	Hypothetical Protein	0,57	1,41	IIM
	Lipid metabolism					
	Membrane transport	BMEII1103	Phosphatidylglycerophosphatase B	0,50	1,38	IIM
	Translation	BMEI0668 BMEI0469 BMEII0517 BMEII0909	Calcium Binding Protein Purine Nucleoside Permease Branched-Chain Amino Acid Transport Protein AzIC Glutamate/Gamma-Aminobutyrate Antiporter	5,77 0,45 0,63 0,63	0,59 1,35 1,51 1,42	P P IIM IIM
	Tansialion	BMEII0332	SSU Ribosomal Protein S21P	0.50	1.33	С
	Unassigned	LINENCOL		0,00	.,	
		BMEI0536	Periplasmic Immunogenic Protein	0.65	1.33	Р

demonstrated, suggesting that *B. melitensis* lacks the classical auto-regulation loop described in numerous QS systems. However this transcriptomic analysis reveals that VjbR has a 2-fold activating effect on *babR* expression whereas BabR has a 1.5-fold repressing effect on *vjbR*.

**Table 2** : VjbR and BabR shared targets ORFs identified by a all transcriptome analysis. The predicted localisation of the corresponding proteins was determined using the Psort program. P : Periplasmic, C : Cytoplasmic, IIM : Integral Inner Membrane, IOM : Integral Outer Membrane, IMAA : Inner Membrane Associated/Anchored, OMAA : Outer Membrane Associated/Anchored.

## Differential Expression of Virulence associated functions in QS mutants

Within the QS regulon defined in this study, 42 ORFs are required for the establishment of cellular and/or murine infection (table 3). As shown in Table 3, VjbR activates the transcription of *virB* genes, as previously demonstrated, a GntR family transcriptional regulator, BMEII0485 coding for a D-galactarate dehydratase and a drug resistance transporter. Unexpectedly, while the *vjbR* deletion mutant is attenuated in all infection models tested [16], this study reveals that VjbR

represses 19 virulence related genes. This group includes, among others, five genes involved in amino acids metabolism (transport and synthesis) and three genes involved in sugar metabolism. VjbR also represses two genes involved in oxidoreduction process (dsbA and sodC) and the hfq gene coding for a RNA binding protein known as host factor I (HF-1). HF-1 is involved in resistance to stationary-phase in a variety of bacteria.

BabR represses the expression of 11 virulence related genes including 7 *virB* genes, *vjbR*, *dnaK* and *lon*. This observation is not contradictory with the full virulence of the *babR* deletion mutant.

	Cellular function	Target gene	Protein	Ratio <i>∆vjbR /</i> wt	Ratio <i>∆babR /</i> wt	Model	Reference(s)
Class I : Repressed by VjbR							
	Amino Acid metabolism	DIAFIOFIO		4.47	1.0		643
		BMEI0516	Aspartate Aminotransferase A	1,47	1,2	HeLa	[1]
		BME10520	Multiple Substrate Aminotransferase	3.42	1,13	Macrophages	[2]
	Biodegradation of xenobiotics						. ,
		BMEII0581	Superoxide Dismutase (Cu-Zn)	1,74	1,17	Macrophages, Mice	[3]
	Carbonydrate metabolism	BMEI1413	GDP-Mannose 4 6-Dehydratase	1.56	1 23	Macrophages Mice	[4]
	degradation	Dillering		1,00	.,20	maerophagee, mee	[1]
		BMEI1440	Thiol:Disulfide Interchange Protein DsbA	1,55	1,21	Macrophages, HeLa	[2]
	Giycan biosynthesis	BMEI0008	Glycosyltransferase	1 35	0.91	Mice	[4] [5]
	Lipid metabolism	DIVIEI0330	orycosyntansicrasc	1,00	0,51	WICC	[-], [0]
	·	BMEI2000	Phospholipid N-methyltransferase	1,48	1,18	Macrophages, Mice	[6]
	Membrane transport	DMEI0259	Dermane Dretein Lidd	1 5	0.08	DEI	[0]
		BMEI0236	Perinlease Protein Live Perinlasmic Dipentide Transport Protein Precursor	2.04	0,98	Hella	[2]
		BMEI1249	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,34	1,4	Mice, cattle and goats	[7]
		BMEI1742	ABC Transporter ATP-Binding Protein	1,78	1,83	Mice	[2]
		BMEII0487	Nickel-Binding Periplasmic Protein Precursor	1,52	0,99	DFI, Mice	[2]
		BMEII0625	Spermidine/Putrescine-Binding Periplasmic Protein	5,56 1,99	0,82	Mice	[0] [2]
		BMEI0626	Multiple Substrate Aminotransferase	3,42	1,13	Macrophages	[2]
	Translation						
		BMEI0781	DNA-Directed RNA Polymerase Alpha Chain	1,67	1,16	MICe Mice macrophages	[9] [10] [11]
	Unassigned	DIVIEIOUTZ		1,70	1	Mice, macrophages	[10], [11]
		BMEI1859	Integral Membrane Protein	1,4	1,14	Macrophages	[2]
		BMEII0017	Omp10	1,47	1,09	Mice	[12]
Class II : Actvated by VjbR							
	Carbohydrate Metabolism	BMEII0485	D-Galactarate Debydratase	0.67	0.8	Hel a	[2]
	Folding, sorting and degradation	DIVIEIT0405		0,07	0,0	HELA	[2]
	logidadion	BMEII0025	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog	0,15	1,43	Hela	[15]
		BMEII0026	Attachment Mediating Protein VirB2 Homolog	0,11	1,57	Hela	[15]
		BMEII0027	Channel Protein VirB3 Homolog	0,15	1,56	Hela	[15]
		BMEII0028	ATPase VIRB4 Homolog Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog	0,33	1,56	Hela	[15]
		BMEII0020	Channel Protein VirB6 Homolog	0,61	1,26	Hela	[15]
		BMEII0032	Channel Protein VirB8 Homolog	0,5	1,55	Hela	[15]
		BMEII0033	Channel Protein VirB9 Homolog Channel Protein VirB10 Homolog	0,72	1,58	Hela	[15]
	Membrane transport	51012110034		0,00	1,23		[13]
	Transcription	BMEI0605	Bicyclomycin Resistance Protein	0,62	1,05	Macrophages	[2]
	Πατιστημιστι	BMEI0881	Transcriptional Regulator, GntR Family	0,63	0,82	Mice	[16]
Class III ·				- ,	- / -		
Repressed by BabR							
	Folding, sorting and degradation						
	abgradatori	BMEI0876	ATP-Dependent Protease La	1,17	1,62	Mice	[17]
		BMEI2002	DnaK Protein	1,1	1,63	Macrophages	[18]
		BMEII0025	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog	0,15	1,44	Hela	[15]
		BMEII0020	Channel Protein VirB3 Homolog	0,15	1,56	Hela	[15]
		BMEII0028	ATPase VirB4 Homolog	0,33	1,56	Hela	[15]
		BMEII0029	Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog	0,26	1,37	Hela	[15]
		BIVIE110032 BME110033	Channel Protein VirB8 Homolog Channel Protein VirB9 Homolog	0,5	1,55	neia Hela	[15]
	Membrane transport	22.100000		5,7 E	.,00		[.0]
		BMEI1249	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,34	1,4	Mice, cattle and goats	[7]
	Iranscription	BMEII1116	Transcriptional Activator LuxR Family	-	1 44	Hela	[2]
L		SMENTIO	ranson paoriar notivator, Eaxist anning	-	.,	11020	( <sup>4</sup> )

Table 3 : Genes required for full infection regulated through QS. DFI : Differential Fluorescence Induction.

## Validation of transcriptional profiling results by qRT-PCR

To validate the results collected from the microarray analysis and to assess the effect of  $C_{12}$ -HSL on particular targets, we performed a reverse transcription experiment followed by quantitative PCR (qRT-PCR) on RNA samples prepared at exponential growth phase (same OD<sub>600</sub> than the transcriptomic experiments). Total RNA was extracted from wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains cultivated with or without  $C_{12}$ -HSL. The selected ORFs are involved in stress response (*dnaK*, groES, groEL) and/or in the virulence of Brucella (dnaK, BMEII0625, BMEI028 and BMEI0433), thus these ORFs are supposed to be expressed during infection. As shown in Table 4, qRT-PCR fold change for the selected targets are comparable to the transcriptomic fold change obtained by the microarray approach, therefore validating the transcriptomic analysis. A control qPCR was made on all samples. In all case these amplifications were not detectable, confirming that no genomic DNA contamination occurs (data not shown). Interestingly, exogenous addition of C<sub>12</sub>-HSL during culture increases mRNA levels of all selected targets in the wt strain. Previous studies have shown that C<sub>12</sub>-HSL can also repress the expression of gene expressed during infection (virB operon, omp10, omp19) [16, 25]. The qRT-PCR experiments also gave the first evidence that BabR also responds to  $C_{12}$ -HSL as the effects of this signal molecule on some targets are still observed in the  $\Delta v j b R$  strain. VjbR and BabR being the sole proteins possessing an AHL-binding domain encoded in the genome of *B. melitensis*, this observation is the first evidence that BabR is able to respond to this signal molecule. Interestingly, depending on the target gene, the C<sub>12</sub>-HSL activating effect seems to be dependent either on BabR (BMEI0433), VjbR (dnaK) or both regulators (BMEI0668, BMEII0625).

		Fold Change								
	groEL		groES		dnaK		BME0668			
	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR		
wt + ACN	1	1	1	1	1	1	1	1		
wt + C <sub>12</sub> -HSL	ND	2,0	ND	2,2	ND	1,6	ND	4,5		
∆babR + ACN	3,2	3,1	3,0	2,7	1,6	1,9	0,6	0,8		
$\Delta babR + C_{12}$ -HSL	ND	4,0	ND	3,3	ND	1,8	ND	3,5		
$\Delta v j b R + A C N$	0,4	0,1	0,5	0,1	1,1	0,9	5,8	4,5		
$\Delta v j b R + C_{12}$ -HSL	ND	0,2	ND	0,2	ND	1,2	ND	9,7		

	Fold Change							
	BMEII0	625	BMEI0	258	BMEI0433			
	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR		
wt + ACN	1	1	1	1	1	1		
wt + C <sub>12</sub> -HSL	ND	1,8	ND	1,3	ND	2,1		
∆ <i>babR</i> + ACN	0,8	0,8	1,0	1,4	1,1	1,1		
$\Delta babR + C_{12}$ -HSL	ND	2,2	ND	0,9	ND	0,8		
∆ <i>vjbR</i> + ACN	5,6	3,8	1,5	3,1	2,0	2,9		
$\Delta v j b R + C_{12}$ -HSL	ND	4,9	ND	5,5	ND	4,4		

**Table 4** : Comparaison of fold change ratios for mRNA corresponding to selected QS targets, obtained by qRT-PCR or miccroarray. RNA was extracted at an equivalent  $OD_{600}$  for the transcriptomic and the qRT-PCR experiments. ND: Not determined. ACN : Acetonitrile:  $C_{12}$ -HSL solvent.  $C_{12}$ -HSL : dodecanoyl-L-homoserine lactone (added to the culture media at a final concentration of 5  $\mu$ M).

## Proteome analysis of Brucella QS mutants

In order to complete our QS-regulon analysis, we performed a 2D-DIGE experiment in parallel to the microarray analysis. Total RNA and total protein samples were prepared from the same cultures to maximize the correlation between these two complementary approaches. We used the 2D-DIGE method to compare total protein extracts from wt and  $\Delta v j b R$  strains and from wt and  $\Delta b a b R$  strains.

For each comparison, two types of gels (pH 4-7 and pH 7-11 NL) were run in triplicate. Two samples (wt/ $\Delta v j b R$  or wt/ $\Delta b a b R$ ) labeled with Cy3 and Cy5 respectively, were analyzed on the same gel, together with an internal standard labeled with Cy2 (see Material and Methods section). We consider that a protein is differentially expressed if it is detected in all gels with a difference in abundance of a least 30% compared to the wt strain (Student's t-test p  $\leq$  of 0.05). All selected proteins were picked, digested and identified using LC-MS/MS.

## ∆vjbR proteome

63 spots showed significant changes in abundance in the vjbR deficient strain (16 spots localized on pH 4-7 gels and 47 spots localized on pH 7-11 NL). Of these 63 spots, 57 were successfully identified and corresponded to 36 different proteins, since several spots correspond to different isoforms of a given protein. As shown in table 5, this set of proteins includes 13 QS targets (43 of the 63 picked spots.

**Table 5** : Comparaison between the transcriptomic and the proteomic analyses. Bolded lines correspond to targets revealed by both transcriptomic and proteomic analyses. Grey lines correspond to targets regulated by both regulators.

			Fold change ratio			
			Micro	array	2D-I	DIGE
	Target gene	Protein	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆ <i>babR</i> /wt	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt
Regulated by VjbR						
	BMEI0035	D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase	1,10	1,01	1,42	-
	BMEI0101	Cysteine Synthase A	1,05	1,37	0,68	-
	BMEI0223	Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase B	1,62	1,15	2,56	-
	BMEI0386	Succinate Semialdehyde Dehydrogenase	1,40	1,09	1,72	-
	BMEI0417	PdhS	0,91	1,20	0,70	-
	BMEI0469	Purine Nucleoside Permease	0,45	1,35	0,18	-
	BMEI0522	Carbamoyl Phosphate Synthase Large Subunit	1,11	1,04	0,60	-
	BMEI0558	Transcriptional Regulator ArsR	1,05	1,13	0,68	-
	BMEI0575	UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-Glutamyl-2,6-DiaminopimelateD-Alanyl-D- Alanyl Ligase	0,86	0,84	3,26	-
	BMEI0741	23S RNA Methyltransferase	1,04	1,01	0,68	-
	BMEI0747	LSU Ribosomal Protein L10P	1,38	1,22	2,37	-
	BMEI0753	SSU Ribosomal Protein S7P	1,37	1,26	1,93	-
	BMEI0837	Glutamyl Trna Synthase	0,99	0,91	1,64	-
	BMEI0851	Enolase	1,62	0,92	1,34	0,56
	BMEI0859	Lipoic Acid Synthetase	1,30	1,23	0,52	-
	BMEI0880	Single Strand Binding Protein	1,02	1,11	2,03	-
	BMEI1029	Outer Membrane Protein ToIC	1,30	1,05	4,22	-
	BMEI1035	ATP-Dependent RNA Helicase	1,30	1,13	1,50	0,78
	BMEI1047	Tyrosyl tRNA Synthase	1,23	1,07	0,68	-
	BMEI1127	Phosphoribosylformylglycinamidine Synthase	0,95	1,07	0,83	-
	BMEI1169	SSU Ribosomal Protein S9P	1,26	0,99	1,93	-
	BMEI1267	Dimethyladenosine Transferase	1,03	1,06	0,40	-
	BMEI1435	Polysaccharide Deacetylase	0,77	1,22	0,37	-
	BMEI1970	S Adenosylmethionine Synthetase	1,57	1,21	1,70	-
	BMEII0002	Ribosomal-Protein-Serine Acetyltransferase	1,17	1,04	1,40	-
	BMEII0032	Channel Protein VirB8 Homolog	0,50	1,55	0,26	-
	BMEII0033	Channel Protein VirB9 Homolog	0,72	1,58	0,49	-
	BMEII0034	Channel Protein VirB10 Homolog	0,65	1,29	2,10	-
	BMEII0092	Replication Protein B	1,06	0,96	1,45	-
	BMEII0374	Alanine Racemase	0,97	1,01	1,41	-
	BMEII0431	Oxidoreductase	0,89	0,87	1,40	-
	BMEII0431	Hypothetical Protein	0,73	0,87	2,47	-
	BMEII0593	Glucose ABC Transporter ATPase	1,62	1,05	2,92	-
	BMEII0863	Oligopeptide Transport ATP-Binding Protein AppD	0,88	1,08	1,45	-
	BMEII0896	Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase	0,83	0,86	3,26	-
	BMEII1028	Tetraacyldisaccharide 4'-Kinase	0,88	0,95	0,52	-

## Table 5 (continued)

				Fold cha	nge ratio	
			Micro	arrav	2D-	DIGE
	<b>T</b>	had a set the day has the set of the set of the set	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
	l arget gene	a identity/similarity/function	∆ <i>vjbR</i> /wt	∆babR /wt	∆ <i>vjbR</i> /wt	∆babR /wt
Regulated						
by BabR	PMEI0006	Electron Transfer Eleventation Poto Subunit	1 00	0.00		1.54
	DIVIEI0090	Particul Pralud Cia Trans Isomoroso	1,00	0,69	-	1,04
	BMEI0123	Succinul CoA Synthetase Beta Chain	1,00	0,97	-	1,52
	BMEI0161	Succinate Dehydrogenase	1,00	1 13	_	0.16
	BMEI0162	Succinate Dehydrogenase Iron-Sulfur Protein	1,23	0.94	_	0.61
	BMEI0176	Porphobilinogene Deaminase	1.11	1.03	-	0.13
	BMEI0219	Malonate-Semialdehyde Dehydrogenase (Acylating) / Methylmalonate-Semialdehyde Dehydrogen	3,27	0,67	-	0,51
	BMEI0223	Membrane Bound Lytic Murein Transglycolase	1,62	1,15	-	1,38
	BMEI0231	NAD Specific Glutamate Dehydrogensase	1,41	1,11	-	0,37
	BMEI0310	Glyceraldehyde 3-Phosphate Deshydrogenase	1,49	1,12	-	1,44
	BMEI0352	Hypothetical Transcription Regulator	1,11	0,89	-	0,36
	BMEI0406	7-Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase	1,04	1,14	-	1,38
	BMEI0451	2-Isopropyl Malate Synthase	0,95	1,11	-	0,21
	BMEI0487	ATP Synthase Beta Subunit/Transription Termination Factor Rho	0,96	1,01	-	1,61
	BMEI0516	Aspartate Aminotransferase	1,47	1,20	-	0,68
	BMEI0543	Choloyigiycine Hydrolase	1,58	0,95	-	0,11
	DIVIEIU500	Diva Repair Protein Reciv	1,00	0,99	-	0,21
	BIVIEI0613	Protease DO	0,73	1,01	-	1,00
	BMEI0712	ChiC Protein / Precorrin 3B C17 Methyltransferase	0.08	1,13	-	2,04
	BMEI0772	D Alanine D Alanine Ligase A	0,30	1,07	_	1 71
	BMEI0727	IFF.Tu	1.81	1 30		1.98
	BME10749	DNA-Directed RNA Polymerase Beta Chain	1 10	1 20	-	0.30
	BMEI0749	DNA-Directed RNA Polymerase Beta Chain	1,10	1,20	_	0.30
	BME10755	FF-Tu	1,10	1 15	-	0.68
	BMEI0778	Adenvlate Kinase	1.28	0.97	-	1.38
	BMEI0780	DNA Directed RNA Polymerase Alpha Chain	1.54	1.24	-	1.93
	BMEI0791	Isocitrate Deshvdrogenase	1.54	1.05	-	0.68
	BMEI0796	31 kDa Immunogenic Protein	0,89	0,97	-	0,44
	BMEI0811	L-Serine Dehydratase	0,78	1,02	-	0,66
	BMEI0836	Citrate Synthase	1,63	1,09	-	0,56
	BMEI0851	Enolase	1,62	0,92	-	1,62
	BMEI0979	Glutamine Synthase	1,18	1,26	-	0,30
	BMEI1112	3-Oxo-Acyl-Carrier Protein Synthase	0,89	0,93	-	1,65
	BMEI1196	EnoyICoA Hydratase	1,08	1,00	-	1,51
	BMEI1201	Hypoyhetical Cytosolic Protein	1,08	1,05	-	2,64
	BMEI1211	General L-Amino Acid-Binding Periplasmic Protein AapJ Precursor	2,05	0,80	-	2,70
	BMEI1320	Electron Transfer Flavoprotein-Ubiquinone Oxidoreductase Precursor	0,92	0,91	-	0,51
	BMEI1367	Superoxide Dismutase Mn	1,79	1,12	-	1,38
	BMEI1404	Mannosyltransferase	1,09	0,92	-	1,38
	BMEI1413	GDP-Mannose 4,6-Dehydratase	1,56	0,99	-	0,68
	BMEI1436	Pyruvate Phosphatase Dikinase	1,05	1,10	-	0,47
	BMEI1451	Processing Peptidase	1,56	1,24	-	0,13
	BMEI1483	LSU Ribosomal Protein L9P	1,45	1,15	-	0,12
	BMEI1620	Ornithine Carbamoyltransferase	1,00	1,20	-	0,64
	BMEI1638		2,31	0,74	-	2,21
	BMEI1643	N Carbamoyi L Amino Acid Amidonydrolase	1,20	0,77	-	1,62
	BMEI1707		1.70	1,02	-	1.60
	DIVIEI1710		1,70	1,10	-	1,02
	BME11770	Fructokinase	1 05	0,09		1 61
	BME11810	Alcohol Dehydrogenase	1 35	1.05	-	1.44
	BMEI1823	DNA Gyrase B	0.80	1,00	-	0.60
	BMEI1915	SSU Ribosomal Protein S1P	1.26	1.46	_	1.77
	BMEI1930	Leucine-, Isoleucine-, Valine-, Threonine-, And Alanine-Binding Protein Precursor	1,45	0.91	-	1,61
	BMEI1939	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	0.81	0.97	-	0.60
	BMEI1961	Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase	1,63	1,28	-	1,66
	BMEI2002	DnaK Protein	1.10	1.63	-	1.78
	BMEI2043	Amidotransferase HisH	0,96	1,04	-	1,74
	BMEII0098	High Affiny Branched Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivF	0,84	0,93	-	1,38
	BMEII0103	Leu Ile Val Binding Protein	1,59	1,06	-	1,85
	BMEII0248	Phosphoglycerate Mutase	1,22	1,05	-	1,74
	BMEII0344	Branched Chain Amino Acid ABC Transporter Pariplasmic Binding Protein	3,40	0,83	-	2,68
	BMEII0358	2-Denyoro-3-Deoxyphosphogalactonate Aldolase	0,93	0,94	-	1,38
	BMEII0371	Is-Alanine Myruvate Transaminase	1,97	0,97	-	1,78
	BMEII0401	I nioredoxine	0,96	1,00	-	1,/1
		Phosphogluconate Denydratase	0,91	0,95	-	0,08
	BIVIEII0559	Ammomeunyitransierase	1,03	1,03	-	1,68
	BIVIEII0590	ATE CDB Pinding Protein APC Transporter	0,50	1.05	-	2,68
	BMEII0593		1,02	1,05	-	1,93
	BMEII0676	DNA Gyrase Subunit B	1,12	1.01		0.57
	BMEII0734	Perintasmic Oligonentide Binding Protein Precursor	15.02	1.04	-	1 76
	BMEII0923	Spermidine/Putrescine-Binding Protein	1 99	0.77	_	1.52
	BMFII1049	60 kDa Chaperonin GroEL	0.35	3.19	-	0.63
	BMEII1116	Transcriptional Activator, LuxR Family	-	1.44	-	0.55
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		,		-,

## ∆babR proteome

On the contrary to what we observed for the comparison of the  $\Delta v j b R$  strain proteome and transcriptome, more targets were found using the proteomic approach in the study of the  $\Delta b a b R$  mutant. Indeed, whereas only 42 BabR targets were discovered using the transcriptomic approach, the proteomic experiment allows the detection of 119 spots of which the abundance differs in the *babR* deficient strain (104 spots localized on pH 4-7 gels and 15 spots localized on pH 7-11 NL). The mass spectrometry analysis of these spots led to the identification of 76 proteins. As illustrated table 5, this set of proteins includes only 6 BabR targets identified by the transcriptomic analysis. An unexpected observation is the fact that numerous proteins corresponding to VjbR transcriptional targets have been identified in the  $\Delta b a b R$  proteome (31 of the 76 proteins identified). One more time, the results suggest a crosstalk between the two QS-regulators of *Brucella*.

## Search for direct VjbR targets using Chromatin Immunoprecipitation

The transcriptomic and proteomic approaches used in the study are two complementary but lead to the identification of both direct and indirect targets. The identification of the DNA binding sites recognized by VjbR and BabR would allow the subsequent identification of the whole direct regulon of Brucella QS regulators. Given the involvement of VjbR in the virulence of B. melitensis, we focused on the identification of VjbR direct targets using a Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP), a powerful technique that allows the detection of protein-DNA interactions in vivo. To use the best conditions to observe a direct binding between VjbR and a target promoter, we used a strain expressing a constitutive VjbR regulator (unresponsive to AHLs). Indeed, the  $\Delta v j b R$ /pSB502 strain expresses under Plac control the vjbR<sub>HTH</sub>-flag allele coding for the helix turn helix domain of VjbR fused with a C-terminal flag tag [25] in a vjbR deficient background. As VjbR is essential for the expression of the virB operon, we controlled that the  $\Delta v_{jb}R$  /pSB502 produces the VirB8 protein, thus proving the functionality of the VjbR<sub>HTH</sub>-flag regulator (data not shown). The immunoprecipitation was made in parallel with the  $\Delta v j b R$  /pSB502 ( $\Delta v j b R$ , Plac-vjbR<sub>HTH</sub>-flag) and the  $\Delta v j b R$  strain harbouring the empty plasmid (pBBR-mcs5) as negative control. Real-Time PCR was then used to quantify upstream regions of targets displaying the highest ratios observed by the transcriptomic analysis.

As shown Figure 2, ChIP analysis reveals an enrichment of target ORFs in the VjbR<sub>HTH</sub>-flag immunoprecipitation compared to the control immunoprecipitation (non-tagged strain). Given that the DNA was sonicated to obtain fragments with an average size of 500 pb, these results suggest that VjbR is able to bind to the promoter region of *virB* operon, *omp25b* (BMEI1007), *omp36* (BMEI1305), BMEII0590 and BMEII0734 both encoding for components of ABC transporters (specific for sugars and oligopeptides respectively), BMEI0668 coding for a putative calcium binding protein and BMEI0030 coding for a hypothetical protein conserved in *P. aeruginosa* (36% of identity, 60% of similarity). Interestingly, three regions of the *virB1-virB2* locus seem to be linked by VjbR. The first one (locus 1 on the top of figure 2) corresponds to the previously defined PvirB promoter [35]. The second and third ones correspond to the *virB1-virB2* intergenic region (435 pb). The group of Sieira has demonstrated by primer extension that *virB* transcription starts at a unique site, however the *virB1-virB2* intergenic region seems to include regulatory site(s) [35].

In an attempt to find the motif recognized by VjbR, we analyzed the upstream regions of ORFs directly bounded by VjbR using the RSAT web resource [36] and the MEME motif discovery tool [37]. The failure to identify a motif within this set of sequences may be explained by a poor conservation of hypothetical VjbR binding sites.



**Figure 2** : ChIP experiments showing direct binding of VjbR on several promoter regions. A : Detection of several *virB1-virB2* regions, B : Detection of BMEII0734, BMEII0590, BMEI0030, BMEI1305, BMEI0668 and BMEI1007 promoter regions. All ChIP were performed with a C-terminal Flag-tagged VjbR-HTH protein expressed from a high copy plasmid (pSB502). The y-axis represents the ratio of immunoprecipited product (IP) versus input (IN) (%IP/IN). White columns represent IP from control strain ( $\Delta v j b R$ , empty plasmid), grey columns represent IP from ( $\Delta v j b R$ , pSB502). Error bars represent standard deviation from three independent experiments.

## Stress responses of B. melitensis QS mutants

We have shown in this study that numerous stress response proteins belongs to QS targets. To confirm this observation, we tested the resistance of both  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  mutants to several kind of stresses. As shown in figure 3A, these QS-mutants behave similarly at pH5, pH7 and pH9. We have also tested the survival rates of those strains at pH4, pH8 and pH6, but no differences were observed (data not shown). On the other hand, the v j b R mutant seems to be delayed in the adaptation to alkaline pH (pH9). *Brucella* response to alkaline stress is not documented, but Appelbe *et al.* have shown that *dnaK* and *groEL* are induced during alkaline stress in *Enterococcus faecalis* [38]. Therefore the delayed adaptation of the  $\Delta v j b R$  strain to alkaline stress could be linked to the activating effect of VjbR on the transcription of *groEL* and BMEI0949 encoding a DnaK suppressor protein homolog.

Surprisingly, while numerous genes encoding stress response proteins involved in adaptation to oxidative stress (*hfq*, *clpA*, *clpB*, *sodC*...) are regulated trough VjbR and BabR, none of the mutants displayed a higher sensitivity to  $H_2O_2$  than the wt strain (data not shown). Those QS-mutants are also insensitive to cold or heat shock (data not shown).

A recent study in *B. abortus* has demonstrated the involvement of cgh, a gene coding for a choloylglycine hydrolase (BMEI0543), in the successful infection through the oral route [39]. CGH is responsible for the inactivation of bile salts present in the gut, thus preventing bacteria from their antimicrobial effects. Our study reveals that VjbR represses the transcription of cgh (transcriptional fold change = 1.58) while BabR strongly activates the production of CGH (proteomic fold change = 0.11). Consequently, we tested the resistance of QS-mutants to bile salts. As shown Figure 3B, the  $\Delta babR$  strain is significantly more sensitive to bile salts than the wt strain. In contrast, the  $\Delta vjbR$  strain displays an enhanced resistance to bile salts. These results are in agreement with the transcriptomic and proteomic experiments and suggest a potential role for BabR in the oral route of infection. For this reason, the virulence of the *babR* mutant should be tested through oral infection.



**Figure 3** : *B. melitensis* QS-mutants response to different stresses. A: wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  response to acid and alkaline stresses. B : wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  resistance to bile salts. Error barrs represent standard deviation from three independent experiments. CFU : colony forming unit.

## Involvement of VjbR and BabR in the regulation of B. melitensis metabolism

The transcriptome and proteome analyses of *vjbR* and *babR* mutants reveal that numerous genes and/or proteins involved in metabolic pathways are regulated through QS. Figure 4 presents a schematic view of the main metabolic pathways in *B. melitensis*, and the effects of *vjbR* and *babR* mutations on these pathways. Our study reveals that VjbR represses three genes encoding enzymes involved in glycolysis (fructose phosphate aldolase, glycerol phosphate dehydrogenase and an enolase), pyruvate dehydrogenase (responsible for the production of acetyl CoA from pyruvate), citrate synthase (responsible for the synthesis of citrate from oxaloacetate and acetyl CoA) and isocitrate dehydrogenase from the TCA cycle. VjbR also represses two enzymes involved in fatty acid metabolism (enoyl-ACP reductase and 3-oxo acyl ACP reductase).

BabR activates three enzymes involved in glycolysis (glycerol phosphate dehydrogenase, phosphoglycerol mutase and an enolase) and represses the production of succinate dehydrogenase, responsible for conversion of succinate into fumarate.


**Figure 4** : Diagram representing the main metabolic pathways in the wt,  $\Delta v_{jb}R$  and  $\Delta babR$  strains. Pentose-P: pentose phosphate pathway, TCA: tricarboxylic acid cycle, G1P: glycerol-1-P, F6P: fructose-6-P, Ga3P: glyceraldehyde-3-P, 3PG: 3-P-glycerate, PYR: pyruvate, OXA: oxaloacetate, ISO: isocitrate, SUC: succinate, Bile salt: glycocholate or taurocholate Red lines/arrows represent repressed pathways in the mutant strains while green lines/arrows represent activated pathways in the mutant strains. a.a.: amino acid.

We assessed the metabolic phenotypes of the two QS-regulator mutants using the Biotype 100 system (Biomerieux), a carbon substrate assimilation system originally proposed for the identification of gram-negative bacteria. As shown in table 6, *B. melitensis* 16M is able to assimilate 12 different substrates (sugars or amino acids). These observations are in agreement with previous studies [40,41].  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains have lost the ability to assimilate malonate and  $\alpha$ -ketoglutarate. The v j b R and b a b R mutants are also unable to grow with aspartate and adonitol (ribitol) respectively as sole carbon source. A striking observation made from this assimilation test is the ability of QS mutants to incorporate substrates that the wt strain is unable to assimilate, thus suggesting that in the condition tested, several metabolic pathways are repressed (directly or indirectly) through QS. Indeed, the v j b R mutant gains the capacity to assimilate D-alanine, D-glucosamine, D-glucosamine, D-glucosamine, D-alanine, fumarate and propionate.

	wt	∆vjbR	$\Delta babR$
N-acetyl D glucosamine	-	-	+
Fumarate	-	-	+
D-Alanine	-	+	+
D-Glucosamine	-	+	+
DL Lactate	-	+	-
L-Tyrosine	-	+	-
Propionate	-	+	+
Adonitol (Ribitol)	+	+	-
L-Fucose	+	+	+
D+ Galactose	+	+	+
D+ Xylose	+	+	+
I Erythritol	+	+	+
L-Glutamate	+	+	+
L-Proline	+	+	+
L-Serine	+	+	+
L+ Arabinose	+	+	+
a-ketoglutarate	+	-	-
L-Aspartate	+	-	+
Malonate	+	-	-

**Table 6** : Carbon assimilation test using the Biotype 100 system (Biomerieux). "+" means bacterial growth after 6 days of incubation at  $37^{\circ}$ C. Grey cells indicate differential assimilation of substrate between wt and QS mutant strains. The results recorded in these table are representative of four independent experiments.

The results obtained from this phenotypic analysis are quite complex to link with transcriptomic and proteomic data as the Biotype 100 system was inoculated according to the manufacturer recommendations, with a bacterial suspension prepared from agar plates. In addition, VjbR and BabR both regulate several transcriptional regulators that could also be responsible for the metabolic behaviour of  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains. Anyway, our results suggest that several metabolic pathways are under QS control in *B. melitensis*. It would be interesting to determine whether these regulations occur during infection.

### Discussion

In this study, we have demonstrated that the expression of a significant fraction of the *B. melitensis* genome (10%) is influenced by the mutation of the QS system. However, microarray experiments measure a steady state level of mRNA and direct effects of LuxR-type regulators on gene expression are certainly less abundants. QS regulated genes are located all along the two chromosomes of *Brucella* (Supplementary Figure S1). These observations are consistent with the hypothesis that QS could act as a global regulatory system in this intracellular pathogen. Similar observations have been previously made in the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* [31,42,43], suggesting that QS seems to be a crucial regulation system in several pathogenic bacteria.

We chose to perform two complementary analyses (microarrays and 2D-DIGE) on extracts obtained from the same cultures samples. We thus hoped to minimize the variations that can occur from one culture to another and to optimize the overlap between these two approaches. However, several differences where observed among the results obtained from these two approaches. First the proteomic analysis of the  $v_{ib}R$  mutant led to the identification of quite few proteins of which the production depend on VjbR compared to the VjbR transcriptome. Several assumptions could explain this observation: (i) the proteome is dependent on many factors that do not interfere with the transcriptome, (ii) proteins that are not abundant are difficult to detect, (iii) all the proteins present in a sample are not equally solubilized, for example membrane proteins are often complex to solubilize. This could be illustrated by the fact that the proteomic analysis led to the detection of only four of the 76 transcriptional VjbR targets with at least one TMH. Secondly, fold change ratios of a given target determined with the microarray or the 2D-DIGE experiments are not always coherent. These effects might result from secondary effects like post-transcriptional regulation through the numerous ribosomal proteins, chaperones and stress proteins regulated by both LuxRtype regulators. Finally, a striking observation made from the *babR* mutant proteome is that among the 95 proteins differentially expressed as compared to the wt strain, there are 48 proteins corresponding to VjbR transcriptional targets. Among this set of proteins, 20 are regulated in an opposite way by both regulators. The transcriptomic analysis of the *babR* mutant gave similar results as 27 of the 42 genes found by this analysis are regulated by both VjbR and BabR.

Our transcriptomic study also reveals that VjbR activates the transcription of babR and that BabR acts as a transcriptional repressor of vjbR. Even if these effects are weak, they could constitute a negative feedback loop that would stabilize this regulation system. The study of the expression of vjbR and babR promoters *in vitro* showed that their maximal expressions occur during the early and late exponentional growth respectively (C. Deschamps, personal communication). All together, these results led us to propose the hypothesis that BabR could act as a modulator of VjbR activity and allow the return to the initial state after the achievement of VjbR regulatory pathway. However this activity doesn't seem to be essential during the infection since the *babR* mutant is not attenuated (B. Taminiau, personal communication).

The qRT-PCR experiment reveals that  $C_{12}$ -HSL has a positive effect either in one or both QSmutant depending on the target. These results suggest that this signal molecule can act on both regulators. Even if our results do not allow us to predict the mechanism underlying this observation, the fact that two regulators react to the same signal molecule is quite unusual. Nevertheless we cannot exclude the possibility that others unidentified AHLs act preferentially on one or the other LuxR-type regulators.

To identify the DNA sequence recognized by VjbR, we used a ChIP experiment using an AHLunresponsive regulator coupled with real-time PCR detection of the most importantly VjbR regulated transcriptional targets. This analysis led to the identification of several genes directly regulated through VjbR. Among them, the *virB* operon seems to possess several regions recognized by the LuxR-type regulator since several regions upstream *virB1* and between *virB1* and *virB2* are enriched in the VjbR IP extracts compared to the control extract. Nevertheless, despite the use of several motif-detection programs (RSATools, MEME...), no conserved motifs were found neither using the upstream sequences of direct VjbR targets nor from different subsets of the whole VjbR transcriptomic targets (data not shown). This observation led to the hypothesis that the sequence recognized by VjbR is poorly conserved between the target promoters.

All together, our results demonstrate that *B. melitensis* possesses an atypical QS regulatory system since: (i) Despite the lack of classical AHL-synthase in this pathogen, QS regulates 10% of the genome in the conditions tested, (ii) BabR seems to behave as a moderator of VjbR activity, (iii)  $C_{12}$ -HSL have an effect both on BabR and VjbR, (iv) QS is involved in the intracellular survival of *B. melitensis* through VjbR and (v) no conserved VjbR binding site was discovered despite the high number of genes regulated through this LuxR-type regulator. Knowing that this intracellular pathogen replicates in individual vacuoles, we suggest that the QS system of *Brucella* should rather be termed "Efficiency Sensing" in agreement with the definition of Hense and co-workers [24].

The ChIP experiments demonstrate that VjbR regulates the expression of several membrane proteins (VirB, Omp25b, Omp36, BMEII0590 and BMEII0734) by direct binding to their promoters. This observation is particularly interesting as the outer membrane of Brucella plays a key role in the virulence of this pathogen. The transcriptomic analysis along with a previous study [25] demonstrates the involvement of VjbR in the control of membrane properties. Indeed, membrane structures as the type IV secretion system VirB, flagellar system, several OMPs and numerous transporters are controlled by this QS-regulator. Similar observations have been made in several studies aiming to characterize the two-component regulatory system BvrR/BvrS. This sensory-regulatory system is crucial for the virulence of Brucella and is involved in the regulation (direct or indirect) of several OMPs, LPS and numerous periplasmic transporters [44-47]. However, neither the recent proteomic analysis of outer membrane fragments released by bvrR and bvrS mutants [47] nor our analyses have demonstrated a link between this regulatory system and VjbR. Nevertheless these analyses have been performed in very dissimilar conditions and we cannot exclude the possibility that these two pathways could be connected. The fact that two regulatory systems involved in membrane control are highly attenuated strengthens the importance of membrane structures in the virulence of this intracellular pathogen.

An interesting observation resulting from the analysis of the VjbR transcriptome data is the presence of Bru-RS1 sequences near several VjbR targets. Bru-RS1 are conserved DNA palindromic sequences of 103 pb [48]. Their function is still unknown, but 30% of the 41 full length Bru-RS1 detected in the *B. melitensis* genome are located upstream (2/12 Bru-RS1) or downstream (10/12 Bru-RS1) VjbR targets, all repressed by this regulator. We propose that these Bru-RS, when transcribed, could act as regulatory RNA in conjunction with the HF-1 protein (Hfq), also repressed by VjbR. The involvement of sRNA in QS regulatory systems is widespread [49-51] and often allows a supplementary level of control on QS targets taking into account environmental conditions [52-53].

Our investigation reveals that VjbR regulates the transcription of numerous genes previously identified as essential to the full virulence of *Brucellae* (Table 3). The fact that this regulator acts positively on the mRNA abundance of some of them and negatively on the others suggests that VjbR could be expressed transiently during the infection, activating specific virulence factors and repressing those that are no more required for the improvement of the infection. Indeed, the transcriptomic and proteomic analyses of the *vjbR* mutant showed that this regulator is probably involved in the activation of several genes/proteins involved in the adaptation of *Brucellae* to the conditions met in the host cell, i.e. : (i) response to oxidative stress (*sodC*, *hfq...*), (ii) adaptation to

the low oxygen tension (*cydA*) [33], (iii) general stress response (*groES*, *groEL*...) and (iv) response to nutrients variation (sugar and amino acid transporters...) since the mRNA abundance of the corresponding mRNA is decreased in the  $\Delta v j b R$  mutant. This observation is particularly interesting as previous studies have suggested that *Brucella* meets nutritionally different environments during its infectious cycle [34, 54-55]. On the other hand, the mutation of v j b R led to the increase of mRNA abundance coding for proteins involved in (i) respiration in aerobic conditions (*coxA*, *coxB*, *coxC*), (ii) several sugar and amino acid transporter, (iii) genes coding for enzymes of the glycolytic and TCA pathway, and (iv) numerous ribosomal proteins. All these observations led us to propose an hypothesis in which VjbR would be a crucial regulator expressed transiently during the infection of host cell. Apart from the fact that VjbR is required for the activation of the TFSS VirB necessary for the formation of the permissive replicative-compartment, we propose that VjbR could be involved in the adaptation of *B. melitensis* to the stressful conditions encountered in host cells and in the slow down of the basic metabolism of *Brucella*, thus avoiding bacterial multiplication until the replicative compartment is reached.

This study is the first report of the impact of QS at the genome scale in an intracellular pathogen. The use of a QS system in the individual vacuole surrounding *Brucella* in the host cell represent a good example of "Efficiency Sensing" since the diffusion of AHLs in these compartments should be delayed compared to environment encountered by *Brucella* before the entry in host cells.

## Materials and methods

## Bacterial strains and culture conditions

*Brucella melitensis* strains were grown with shaking at 37°C in 2YT medium (10% yeast extract, 10 g l<sup>-1</sup> tryptone, 5 g l<sup>-1</sup> NaCl) containing appropriate antibiotics, from an initial optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05. For transcriptomic and proteomic analyses, 100 ml of 2YT without antibiotic were inoculated with wild-type strain,  $\Delta v j b R$  or  $\Delta b a b R$  mutants to an OD<sub>600</sub> of 0.05. Cultures were made in triplicate, and incubated at 37°C with shaking to an OD<sub>600</sub> of 0.75. Ten milliliters of culture was used for proteins preparation, the rest was used for RNA extraction.

Nalidixic acid (Nal) and gentamycin (Gnt) were used at 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> respectively. Synthetic N-dodecanoyl-DL-homoserine lactone (C<sub>12</sub>-HSL; Fluka) was prepared in acetonitrile (ACN) and added to bacterial growth media at 5  $\mu$ M final concentration. The same volume of ACN was used for a negative control.

## **Mutant construction**

The  $\Delta babR$  and  $\Delta v j bR$  mutant strains were constructed by replacing gene coding sequence by kanamycin resistance cassette [26], (Delrue et al., 2005).

For ChIP experiments, the plasmid pSB502 harboring a C-terminal fusion between the flag tag and the  $vjbR_{HTH}$  region coding for the HTH region of VjbR (amino acid 181 to 260) was designed as following. First we constructed the gateway destination vector pSB500 allowing C-terminal fusions of an ORF with the flag tag under Plac control. The Gw-Flag cassette was excised from the pGEMT-Gw-FLAG Cter (from Geraldine Laloux) by a *ApaI/SacI* restriction. The resulting fragment was purified and ligated in the pBBR-mcs5 [56] plasmid restricted by the same enzymes to obtain the destination vector pSB500. The entry clone pSB102 containing  $vjbR_{HTH}$  [25] was used together with the destination vector pSB500 during Gateway LR reaction as described by [57]. The resulting vector pSB502 and the pBBRmcs-5 plasmid (negative control) were introduced in *Brucella melitensis*  $\Delta vjbR$  strain by mating.

Matings were performed by mixing 200  $\mu$ l of of *E. coli* S17-1 donor cells liquid culture (overnight culture) and 1 mL of the *B. melitensis* Nal<sup>R</sup> recipient strain (overnight culture). Cells were centrifuged 2 min at 7000 rpm and washed two times with 2YT. The pellets were resuspended in 10  $\mu$ L of 2YT and spotted on a 2YT plate for 4h. Bacteria were then transferred onto a 2YT plate containing Gnt and Nal. After 3 days of incubation at 37°C, the exconjugates were replicated on a 2YT plate containing Nal and Gnt.

## **Microarray experiments**

## RNA preparation

Total RNA was extracted from wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  (all cultured in triplicate) as following: 45 ml of culture (OD<sub>600</sub> of 0.75) were centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Bacterial pellets were resuspended in 100  $\mu$ l SDS 10% and 20  $\mu$ l proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C with shaking for 1h. Five milliliters of TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) were added and suspensions were vigorously shacked. After 10 min of incubation at 65°C, 1 ml chloroform was added to the suspensions and the mixes were shaked and incubated at room temperature for 5-10 min. Samples were centrifuged at 14.000 rpm for 15 min at 4°C. Then, 2.5 ml propan-2-ol were added to the aqueous phases and samples were stored overnight at -20°C. After centrifugation for 30 min at 14.000 rpm at 4°C, pellets were washed with 75% ethanol RNase free. Supernatants were discarded and pellets were dried 15 min at room temperature. Total RNA samples were resuspended in 100  $\mu$ l

RNase free water, incubated 10 min at 55°C and stored at -80°C. The integrity of the RNA and the absence of DNA were checked by gel electrophoresis.

## Microarray design and experimentation

Microarray design and experimentation were made by NimbleGen<sup>TM</sup> Systems, Inc from catalogue design for *B. melitensis* 16M chromosomes I (NC\_003317) and II (NC\_003318) with 20 probes per gene (10 perfect matches and 10 mismatches). Each probe (24 mer) was replicated three times on chip (design includes random GC probes). Triplicate samples of each strain were mixed and one chip was made per strain. The microarray data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo) and are accessible for reviewers by following this link : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=bdclpmqassoyufm&acc=GSE8844. All of the analysis was performed using the statistical program R using the package *stats* [60]. Chip data used were preprocessed using the RMA algorithm [61], as provided by NimbleGen<sup>TM</sup> Systems, Inc. Two pairwise comparisons were performed ( $\Delta v j b r$ -wt) and ( $\Delta b a b r$ -wt). For each comparison, the foldchange was computed as the ratio of intensity averages (mutant/wt). A Student T test was used as statistical analysis, for over-expression and under-expression. Genes presenting both a

foldchange greater than 1.3 (or below 0.7) and a statistical test significant at the alpha level 0.005

were selected as under/over-expressed between the two conditions.

## **2D-DIGE**

Proteins were extracted from 10 ml of wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  cultures (OD<sub>600</sub> 0.75) in triplicate. Cultures were centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Bacterial pellets were washed three times with 20 ml PBS before resuspension in 2 ml chloroform. The mixes were incubated at room temperature for 1 h and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C. Pellets were resuspended in PBS to obtain an OD<sub>600</sub> of 100 and three freeze/thaw cycles were realized. Proteins were quantified with the BCA Protein Assay from Pierce and protein concentration was adjusted to 5-10  $\mu g \mu l^{-1}$ . Samples were aliquoted by 100  $\mu g$  and one volume of trichloroacetic acid (TCA) 10% was added. The mixes were incubated 5 min on ice and centrifuged at 14 000 rpm for 3 min at 4°C. Pellets were resuspended in one volume of TCA 5% and the mixes were incubated 5 min on ice. Samples were centrifuged at 14 000 rpm for 3 min at 4°C and pellets were washed with ice cold acetone. After centrifugation an additional centrifugation step, pellets were resuspended in a mix of 40  $\mu$ l Buffer 1 (40  $\mu$ M Tris HCl pH 8.5, 0.3% SDS) and 4  $\mu$ l Buffer 2 (0.4 M Tris HCl pH 8.5, 1 mg ml<sup>-1</sup> DNaseI, 0.25 mg ml<sup>-1</sup> RNase A; 50 mM MgCl<sub>2</sub>).

We used the 2D-DIGE method to compare total protein extracts from wt and  $\Delta v j b R$  strains and from wt and  $\Delta babR$  strains. For each comparison, two types of gels (pH 4-7 and pH 7-11 NL) were run in triplicate. Proteins were labeled according to the manufacturer with CyDye<sup>TM</sup> DIGE Fluor, minimal dyes (Amersham Biosciences), which allows the detection of two pre-labeled protein samples and an internal standard on the same 2-D electrophoresis gel. Two samples of 25  $\mu$ g (wt and  $\Delta v j b R$  or wt and  $\Delta b a b R$ ) were labeled with Cy3 and Cy5 respectively and analyzed on the same gel together with an internal standard labeled with Cy2 (25  $\mu$ g). The internal standard was a pool that included an equal amount of proteins of all samples run on triplicate gels. Labeled proteins were first separated by isoelectric focusing in IPG gels, linear pH 4-7 gradient or non-linear pH 7-11 gradient, using IPGphor (Amersham Biosciences). IPG pH 4-7 gels were run for 3h at 300 V, 6h at 1 000 V, 3h at 8 000 V and 50 000 Vh at 8 000 V and non-linear IPG pH 7-11 gels were run for 4h at 500 V, 7h at 1 000 V, 3h at 8 000 V and 60 000 Vh at 8 000 V. First-dimension gels were layed down on the top of 10% polyacrylamide gels and run using the Ettan Dalt II System (Amersham Biosciences) at constant 1.5W per gel for 18h overnight at 15°C. Gels were scanned with the Typhoon<sup>™</sup> 9600 laser scanner (Amersham Biosciences) and images were analyzed with the DeCyder<sup>®</sup> Differential Analysis Software (Amersham Biosciences).

The differential in-gel analysis mode of DeCyder<sup>®</sup> software was used to merge the Cy2, Cy3, and Cy5 images for each gel and to detect spot limits for the calculation of normalized spot volumes/protein abundances and to determine abundance differences between samples run on the same gel. The biological variation analysis mode of DeCyder<sup>®</sup> was then used to match all pair wise image comparisons from difference in-gel analysis for a comparative cross-gel statistical analysis. Comparison of normalized Cy3 and Cy5 spot volumes with the corresponding Cy2 standard spot volumes within each gel gave a standardized abundance. This value was compared across all gels for each matched spot and a statistical analysis was performed. The Biological Variation Analysis (BVA) provides the average ratios between wt and mutated strain, with a treshold at +/- 1.3 and a t-test confidence  $\leq$  of 0.05, genearating a list of spots of intersest. All selected spots were picked, digested and identified using LC-MS/MS.

## LC-MS/MS

Selected spots were identified from preparative gels charged with 300  $\mu$ g of proteins (from wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  triplicate samples) and stained with Ruthenium [58].

Protein spots were excised from the gels with a SPOT Picker (Amersham Biosciences) before in-Gel tryptic digestion performed as previously described (Shevchenkoet al., 1996). Briefly, peptides were extracted using water and acetonitrile followed by 5% formic acid and then acetonitrile. The dried samples were reconstituted in 5% formic acid, desalted on stage tips (Proxeon) and concentrated on nano-scale reversed phase disposable columns prior to MS analysis. The proteins were micro-sequenced using a nano-electrospray Q-tof 2MS/MS instrument (Waters, Milford, USA). The amino-acid sequences were obtained by de novo interpretation and sequence similarity searches were performed by MSBLAST search against the NCBI *Brucella melitensis* 16M sequence database.

## **Quantitative real-time RT-PCR**

Total RNA samples were prepared as described above on *B. melitensis* 16M wild-type strain grown in 2YT with 5  $\mu$ M final concentration C<sub>12</sub>-HSL or ACN at 37°C with shaking to an OD<sub>600</sub> of 0.75. Samples were treated for DNA digestion with DNA-free<sup>TM</sup> kit (Ambion) and reverse-transcription realized with SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase (Invitrogen). cDNA samples were used as template in real-time PCR reactions. Primers were designed with PrimerExpress<sup>®</sup> 1.0 (Applied Biosystems; sequences are listed in table S2, supplementary data), PCR products ranged from 80 to 100 bp. Real-time PCR reactions were performed with SYBR Green Mix (Applied Biosystems) in 96-well Optical Reaction plates (Applied Biosystems). Relative quantification using a standard curve method was performed for each primer in an Applied Biosystems 7900HT real-time PCR instrument (absolute quantification method).

## Chromatin immunoprecipitation assay

 $\Delta v j b R$  pSB502 (encoding  $v j b R_{HTH}$  C-terminal flag fusion) and  $\Delta v j b R$  pBBR-mcs5 (negative control) strains were grown 2YT at 37°C to OD<sub>600</sub> 0.75. ChIP experiments were performed essentially as described [59] using anti-flag m2 monoclonal antibodies (Sigma). Briefly, after bacterial growth, formaldehyde (1%) was added to 10 ml of triplicate cultures and placed at room temperature for 10 min before quenching the reaction with glycine (125 mM) for 5 min. Bacteria were collected and washed with cold phosphate-buffered saline twice. The cells were lysed in 0.9 ml of lysis solution

(10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20% sucrose, 20 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme) and 0.9 ml of 2x RIPA solution (100 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 % Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.2% SDS). The cell extracts were sonicated to fragment DNA to an average size of 500 bp and centrifuged 30 min at 13 000 rpm 4°C, supernatants were stored at -80°C. 15  $\mu$ l of the extract was removed for total DNA preparation. For immunoprecipitation of VjbR cross-linked DNA, a portion of the extracts (500  $\mu$ l) was first cleared with 80  $\mu$ l of sepharose-Proteine G beads (Sigma) for 1h at 4°C and then incubated with 4  $\mu$ l of monoclonal anti-flag m2 antibodies (Sigma) for 4h at 4°C. The beads were washed twice with 1x RIPA solution, then twice with LiCl/detergent solution (10 mM Tris pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate), and finally with TE buffer. The immunoprecipitated material was eluted with 130  $\mu$ l of elution buffer (25 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.5% SDS) for 20 min at 65°C. Cross-linking of immunoprecipitated and total DNA was reversed by incubation at 65 °C overnight. After pronase treatment, the immunoprecipitated and total DNA were purified using PCRapace Kit (Invitek GmbH, Germany) according to the manufacturer.

Analysis of the immunoprecipitated DNA was performed using quantitative PCR with input and immunoprecipitated DNA samples as templates. All promoter-specific primers were designed with Primer Express<sup>®</sup> 1.0 (Applied Biosystems, see table S2 in supplementary data) for amplicon sizes and primer localization and sequences). PCR products ranged from 80 to 100 bp. Real-time PCR reactions were performed in 25  $\mu$ l SYBR Green Mix (Applied Biosystems) in 96-well Optical Reaction plates (Applied Biosystems). Relative quantification using a standard curve method was performed for each primer in an Applied Biosystems 7900HT real-time PCR instrument (absolute quantification method). Input DNA values were used to normalize ChIP, which are presented as a percentage of precipitated DNA (IP)/total DNA (IN).

#### Assessment of B. melitensis to stress response

#### Alkaline and acid resistance

The wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains were grown in 2YT up to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.05 in 2YT adjusted to the required pH with HCl or NaOH. Cultures were incubated at 37°C with shaking for 72h, and OD<sub>600</sub> were measured after 24, 48 and 72h of incubation.

#### Resistance to bile salts

In vitro resistance of wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains to bile salts were evaluated as follow. The wt,  $\Delta v j b R$  and  $\Delta b a b R$  strains were grown in 2YT up to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and were diluted to an OD<sub>600</sub> 0.05 in 2YT or in 2YT containing 0.1% bile salts (Fluka). Cultures were then incubated at 37°C with shaking for 18h and serial dilutions were plated on 2YT medium for CFU counting.

#### Biotype100® substrate assimilation test

In the present study, carbon assimilation test were carried out using the Biotype 100 carbon assimilation system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) originally proposed for the identification of other Gram-negative bacteria, which comprises 99 carbohydrates, organic acids, amino acids, other carbon substrate and a negative control. The inoculum was obtained by taking several identical colonies from a fresh pure culture on 2YT agar and resuspending them in 5 ml of sterile distilled water to prepare a suspension with a turbidity equivalent to 3 on the McFarland Standard (BioMérieux). Two milliliters of this preparation was transferred into the semi-solid assimilation medium Biotype Medium 2 (BioMérieux). Each of the system microtubes was filled with 400  $\mu$ l of this inoculum. Growth was observed after 6 days of incubation at 37°C. A test was recorded as

positive when the degree of opacity in the microtube was higher than the one observed for the negative control.

# Acknowledgments

We thank past and present members of Brucella team of the URBM for fruitful discussions.

This work was supported by the Comission of the European Communities, Contract no. QLK2-CT-1999-00014 and the FRFC.

S. Uzureau and J. Lemaire hold a specialization grant from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (FRIA).

#### References

- 1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV (2006) The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 6: 91-99.
- 2. Smith LD, Ficht TA (1990) Pathogenesis of Brucella. Crit Rev Microbiol 17: 209-230.
- 3. Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3: 213-221.
- 4. Moreno E, Moriyon, I. (2001) The genus *Brucella*. In: Dworkin M, Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (Eds.), editor. The prokaryotes Electronic version: Springer, New York.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, et al. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 443-448.
- 6. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, et al. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13148-13153.
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, et al. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 187: 2715-2726.
- 8. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzman-Verri C, Chacon-Diaz C, et al. (2007) *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. PLoS ONE 2: e631.
- 9. Roop RM, 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. Mol Microbiol 52: 621-630.
- 10. Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, et al. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15711-15716.
- 11. Kohler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, et al. (2002) The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. Vet Microbiol 90: 299-309.
- 12. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, et al. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect Immun 66: 5711-5724.
- 13. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun 58: 2320-2328.
- 14. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP (1998) Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. Infect Immun 66: 2387-2392.
- Porte F, Liautard JP, Kohler S (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella* suis is essential for intracellular survival in murine macrophages. Infect Immun 67: 4041-4047.
- 16. Delrue RM, Deschamps C, Leonard S, Nijskens C, Danese I, et al. (2005) A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. Cell Microbiol 7: 1151-1161.
- 17. Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 6: 56-60.

- 18. Ulrich RL, Deshazer D, Hines HB, Jeddeloh JA (2004) Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. Infect Immun 72: 6589-6596.
- Zhu J, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, et al. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 3129-3134.
- 20. Sjoblom S, Brader G, Koch G, Palva ET (2006) Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. Mol Microbiol 60: 1474-1489.
- 21. Hastings JW, Nealson KH (1977) Bacterial bioluminescence. Annu Rev Microbiol 31: 549-595.
- 22. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 176: 269-275.
- Redfield RJ (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends Microbiol 10: 365-370.
- 24. Hense BA, Kuttler C, Muller J, Rothballer M, Hartmann A, et al. (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? Nat Rev Microbiol 5: 230-239.
- 25. Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2007) Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in Brucella melitensis. J Bacteriol 189: 6035-6047.
- 26. Taminiau B (2003) Etude du Quorum Sensing chez Brucella melitensis 16M. Thèse.
- 27. Taminiau B, Daykin M, Swift S, Boschiroli ML, Tibor A, et al. (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Infect Immun 70: 3004-3011.
- Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, et al. (2005) The sheathed flagellum of Brucella melitensis is involved in persistence in a murine model of infection. Cell Microbiol 7: 687-698.
- 29. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. Cell Microbiol 3: 159-168.
- 30. DeLisa MP, Wu CF, Wang L, Valdes JJ, Bentley WE (2001) DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. J Bacteriol 183: 5239-5247.
- 31. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. J Bacteriol 185: 2080-2095.
- 32. Moreno E, Moriyon I (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1-3.
- 33. Loisel-Meyer S, Jimenez de Bagues MP, Kohler S, Liautard JP, Jubier-Maurin V (2005) Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for *in vitro* and intramacrophagic multiplication. Infect Immun 73: 7768-7771.
- 34. Kohler S, Ekaza E, Paquet JY, Walravens K, Teyssier J, et al. (2002) Induction of *dnaK* through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*. Infect Immun 70: 1631-1634.

- 35. Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. Mol Microbiol 54: 808-822.
- 36. van Helden J (2003) Regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res 31: 3593-3596.
- 37. Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic Acids Res 34: W369-373.
- Appelbe OK, Sedgley CM (2007) Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. Oral Microbiol Immunol 22: 169-174.
- 39. Delpino MV, Marchesini MI, Estein SM, Comerci DJ, Cassataro J, et al. (2007) A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. Infect Immun 75: 299-305.
- 40. Essenberg RC, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I (2002) Sugar metabolism by *Brucellae*. Vet Microbiol 90: 249-261.
- 41. Lopez-Merino A, Monnet DL, Hernandez I, Sanchez NL, Boeufgras JM, et al. (2001) Identification of *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, and *B. suis* by carbon substrate assimilation tests. Vet Microbiol 80: 359-363.
- 42. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J Bacteriol 185: 2066-2079.
- 43. Wagner VE, Gillis RJ, Iglewski BH (2004) Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine 22 Suppl 1: S15-20.
- 44. Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyon I, et al. (1998) A twocomponent regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Mol Microbiol 29: 125-138.
- 45. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckaert A, et al. (2002) The twocomponent system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 12375-12380.
- 46. Manterola L, Moriyon I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, et al. (2005) The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. J Bacteriol 187: 5631-5639.
- 47. Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter J, Schirm M, et al. (2007) Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. J Proteome Res 6: 1519-1529.
- 48. Halling SM, Bricker BJ (1994) Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella spp.*: Bru-RS1 and Bru-RS2. Mol Microbiol 14: 681-689.
- 49. Hammer BK, Bassler BL (2007) Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- 50. Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiol Rev 30: 274-291.

- 51. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, et al. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. Embo J 12: 3967-3975.
- 52. Toledo-Arana A, Repoila F, Cossart P (2007) Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. Curr Opin Microbiol 10: 182-188.
- 53. Bejerano-Sagie M, Xavier KB (2007) The role of small RNAs in quorum sensing. Curr Opin Microbiol 10: 189-198.
- 54. Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrate P, Danese I, Bielarz V, et al. (2001) Identification of *Brucella spp.* genes involved in intracellular trafficking. Cell Microbiol 3: 487-497.
- 55. Dozot M, Boigegrain RA, Delrue RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, et al. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*. Cell Microbiol 8: 1791-1802.
- 56. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, et al. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176.
- 57. Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, et al. (2004) Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. Genome Res 14: 2201-2206.
- 58. Lamanda A, Zahn A, Roder D, Langen H (2004) Improved Ruthenium II tris (bathophenantroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-tobackground ratio and improved baseline resolution. Proteomics 4: 599-608.
- 59. Kuras L, Struhl K (1999) Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. Nature 399: 609-613.
- 60. R\_Development\_Core\_Team (2006). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, *R Foundation for Statistical Computing*.
- 61. Irizarry, R. A., B. Hobbs, et al. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2): 249-264.

# **Supplementary figures**



**Supplementary figure S1** : Localization of VjbR and BabR target gene along *B. melitensis* chromosomes. A : fold change ratios of VjbR-regulated ORFs located on chromosome I, B: fold change ratios of VjbR-regulated ORFs located on chromosome II, C: fold change ratios of BabR-regulated ORFs located on chromosome I and D: fold change ratios of BabR-regulated ORFs located on chromosome II.

**Supplementary table 1**: VjbR and BabR targets. ND : Not determined. The predicted localisation of proteins was determined using the Psort program. P : Periplasmic, C : Cytoplasmic, IIM : Integral Inner Membrane, IOM : Integral Outer Membrane, IMAA : Inner Membrane Associated/Anchored, OMAA : Outer Membrane Associated/Anchored

				Miero	Fold Cha	nge ratio		
	Cellular function affected	Target	Protein	Ratio ∆vjbR /wt	Ratio ∆babR /wt	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Predicted cellular localisation
Class I : Repressed by VjbR	Amino Acid							
	metabolism	BMEI0219	Malonate-Semialdebyde Debydrogenase (Acylating)	3.27	0.67	ND	0.51	C
		BME10210	Succinate Semialdehyde Dehydrogenase	1,40	1,09	1,72	ND	c
		BMEI0516	Aspartate Aminotransferase A	1,47	1,20	ND	0,68	С
		BMEI0526 BMEI0791	Carbamoyi-Phosphate Synthase Small Chain Isocitrate Dehydrogenase (NADP)	1,76	1,13	ND ND	ND 0.68	C C
		BMEI0851	Enolase	1,62	0,92	1,34	0,56	c
		BMEI0854	Pyruvate Dehydrogenase E1 Component, Alpha Subunit	1,50	1,19	ND	ND	С
		BMEI1125 BMEI1604	Maleylpyruvate Isomerase 5-Aminoleyulinic Acid Synthase	1,37	1,12 1,20	ND ND	ND ND	C C
		BMEI1638	Glutamate Synthase (NADPH) Small Chain	2,31	0,74	ND	2,21	c
		BMEI1757	Omega-Amino Acid-Pyruvate Aminotransferase	2,02	1,15	ND	ND	С
		BMEI1923 BMEI1924	Isovaleryi-CoA Denydrogenase Methvlcrotonvi-CoA Carboxvlase	3,03	1,00	ND ND	ND ND	c
		BMEI1925	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha Chain / Propionyl-CoA Carboxylase Alpha Chain	1,84	1,14	0,75	ND	С
		BMEI1926	Hydroxymethylglutaryl-CoA Lyase	1,47	0,98	ND	ND	C
		BMEI2029	Adenosylhomocysteinase	1,57	1,21	ND	ND	C
		BMEII0371	Omega-Amino Acid-Pyruvate Aminotransferase	1,97	0,97	ND	1,78	C
		BMEII0374	Alanine Racemase	0,97	1,01	1,41	ND ND	C
		BMEII0748	2-Oxoisovalerate Dehydrogenase Deta Gubunit 2-Oxoisovalerate Dehydrogenase Alpha Subunit	2,77	1,07	ND	ND	c
	Biodegradation of							
	Xeriobiotics	BMEI1367	Superoxide Dismutase (Mn)	1,79	1,12	ND	1,38	Р
		BMEI1512	Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein) Reductase (NADH)	1,84	1,09	ND	0,74	С
		BMEI1747 BMEI1819	Aldenyde Denydrogenase Alcohol Dehydrogenase Class lii	2,37	1,98 1.05	ND ND	ND 1.44	IMAA
		BMEI1927	Enoyl-CoA Hydratase	1,64	1,05	ND	ND	С
		BMEII0581	Superoxide Dismutase (Cu-Zn)	1,74	1,17	ND	ND	C
	Biosynthsesis of	BIVILITIOOD		1,45	1,15	ND	ND	U
	secondary metabolites							
	metaboliteo	BMEII0015	Homospermidine Synthase	1,54	0,97	ND	ND	С
	Carbohydrate	BMEII0016	Homospermidine Synthase	1,74	0,97	ND	ND	С
	metabolism							
		BMEI0223	Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase B	1,62	1,15	2,56	ND ND	C C
		BMEI0310	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase	1,50	1,12	ND	1,44	P
		BMEI0836	Citrate Synthase	1,63	1,09	ND	0,53	Р
		BMEI1413	GDP-Mannose 4,6-Denydratase	2.06	1,23	ND ND	0,68 ND	C C
		BMEII0815	Acetyl-Coenzyme A Synthetase	1,70	0,85	ND	ND	С
	Cell Growth and death							
		BMEI0961	Kinesin-Like Protein	1,32	1,11	ND	ND	С
	Energy	BMEI1184	Small Protein A	1,47	1,00	ND	ND	OMAA
	metabolism	DMELOOZO	hanna's Daracharachatara	0.00	1.04	ND	ND	-
		BMEI0076	Carbonic Anhydrase	2,92	1,34	ND ND	ND ND	C
		BMEI0248	ATP Synthase Delta Chain	1,47	1,08	ND	ND	C
		BMEI0249	ATP Synthase Alpha Chain	2,09	1,25	ND	0,76	C
		BMEI0251 BMEI0473	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Iron-Sulfur Subunit	2,10	0,97	ND	ND	c
		BMEI0474	Cytochrome B	2,26	0,97	ND	ND	IIM
		BMEI0475	Cytochrome C1 H+ Translocating Pyrophosphate Synthese	1,56	0,89	ND ND	ND ND	C C
		BMEI1231	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 18 Kd Subunit	1,66	1,15	ND	ND	c
		BMEI1462	Cytochrome C Oxidase Polypeptide lii	1,89	1,05	ND	ND	IIM
		BMEI1465 BMEI1466	Cytochrome C Oxidase Polypeptide I Cytochrome C Oxidase Polypeptide I	2,01	1,09	ND ND	ND ND	IIM
		BMEI1545	ATP Synthase C Chain	2,07	0,89	ND	ND	IIM
		BMEI1564	Cytochrome C Oxidase Polypeptide I Homolog, Bacteroid	2,09	0,90	ND	ND	IIM
		BMEII0423	Fructose-Bisphosphate Aldolase	1,65	0,98	ND	ND	C
	Folding, sorting							
	and degradation	BMEI0874	ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit	1,66	1,49	ND	ND	С
		BME10949	DnaK Suppressor Protein Homolog	1,91	1,19	ND	ND	С
		BMEI1035	ATP-Dependent RNA Helicase Sec-Independent Protein Translocase Protein TATA	1,30	1,13	1,50 ND	0,78 ND	C C
		BME11129	Glutaredoxin	1,35	1,04	ND	ND	c
		BMEI1440	Thiol:Disulfide Interchange Protein DsbA	1,55	1,21	ND	ND	P
		BMEI2022 BMEI2055	I nioredoxin C-1 Protein Translocase Subunit SecB	2,18	0,94 1.21	ND ND	ND ND	C C
		BMEII0891	Disulfide Bond Formation Protein B	1,45	1,16	ND	ND	IM
	Glycan biosynthesis							
		BME10998	Glycosyltransferase	1,35	0,91	ND	ND	Р

	Outbulanturation	1		Micro	Datia	2D-[	DIGE	Predicted
	affected	Target	Protein	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	cellular
	Hypothetical							localisation
		BMEI0262	Hypothetical Protein	1,48	0,94	ND	ND	IIM
		BME10298	Hypothetical Protein	1,35	1,05	ND	ND	P
		BMEI0373	Hypothetical Protein	1,93	0,81	ND	ND	Р
		BMEI0427 BMEI0495	Hypothetical Protein	1,82 1.61	1,08	ND ND	ND ND	C IIM
		BMEI0497	Hypothetical Membrane Spanning Protein	1,71	1,28	ND	ND	С
		BMEI0535	Hypothetical Protein	1,83	1,15	ND	ND	IIM
		BME10542 BME10603	Hypothetical Protein	1,66	1,00	ND	ND	C
		BMEI0607	Hypothetical Cytosolic Protein	2,36	0,97	ND	ND	С
		BMEI0721 BMEI0722	Hypothetical Cytosolic Protein Hypothetical Protein	2,01	1,08	ND ND	ND ND	C C
		BMEI0853	Hypothetical Protein	1,45	1,18	ND	ND	C
		BMEI0870	Hypothetical Protein	1,82	0,81	ND	ND ND	C
		BMEI1206	Hypothetical Cytosolic Protein	1,60	1,16	ND	ND	C
		BMEI1246	Hypothetical Cytosolic Protein	2,04	1,12	ND	ND	С
		BMEI1479 BMEI1494	Hypothetical Protein	2,15	1,46	ND ND	ND ND	P
		BMEI1539	Hypothetical Protein	1,64	1,04	ND	ND	Р
		BMEI1599 BMEI1866	Hypothetical Protein	1,64 1.48	1,00	ND ND	ND ND	C C
		BMEI1889	Hypothetical Protein	1,56	1,12	ND	ND	P
		BMEI1918	Hypothetical Cytosolic Protein	1,76	0,96	ND	ND	С
		BMEII0277	Hypothetical Cytosolic Protein	1,83	1,12	ND	ND	c
		BMEII0421	Hypothetical Protein	2,61	0,98	ND	ND	С
		BMEII0431 BMEII0552	Hypothetical Protein	0,73 1 71	0,87	2,47 ND	ND ND	C C
		BMEII0652	Hypothetical Protein	2,66	1,06	ND	ND	c
		BMEII0692	Hypothetical Membrane Associated Protein	1,65	1,05	ND	ND	С
		BMEII0733 BMEII0774	Hypothetical Protein	2,23	0.81	ND ND	ND ND	C
		BMEII0892	Hypothetical Protein	1,88	1,09	ND	ND	Р
		BMEII0905	Hypothetical Protein	1,34	1,12	ND	ND ND	IIM
		BMEII0924 BMEII1031	Hypothetical Cytosolic Protein	1,80	1,09	ND	ND	c
	Lipid metabolism							
		BMEI0319	BioY Protein	1,47	1,18	ND	ND	IIM
		BMEI0543	CholoyIglycine Hydrolase	1,58	0,95	ND	0,11	IIM
		BMEI0575 BMEI1475	Acyl Carrier Protein	1,57	0,84	3,26 ND	ND ND	C
		BMEI1512	Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein) Reductase (NADH)	1,84	1,09	ND	0,74	С
		BMEI1928 BMEI2000	Enoyl-CoA Hydratase	1,95 1.48	1,06	ND ND	ND ND	C C
		BMEII0816	3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier Protein) Reductase	2,05	1,06	ND	ND	c
	Membrane transport							
	tidiloport	BMEI0070	Aquaporin	1,44	1,03	ND	ND	IIM
		BMEI0258 BMEI0263	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport System Permease Protein LivH	1,50 2 27	0,98	ND ND	ND ND	IIM
		BME10200	Peptidoglycan-Associated Lipoprotein	2,12	1,31	ND	ND	IOM
		BMEI0411	Putrescine-Binding Periplasmic Protein	1,62	0,91	ND	ND	P
		BMEI0433	Outer Membrane Protein W Precursor	2,04	0,90	ND	ND	IOM
		BMEI0569	Manganese Transport Protein MntH	1,86	1,32	ND	ND	IIM
		BMEI0668 BMEI1007	Calcium Binding Protein 25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	5,77 6.52	0,59	ND ND	ND ND	IOM
		BMEI1022	Arginine/Ornithine-Binding Periplasmic Protein Precursor	1,99	1,00	ND	ND	P
		BMEI1026	Long-Chain Fatty Acid Transport Protein	6,69	0,95	ND	ND	IOM
		BMEI1029 BMEI1208	General L-Amino Acid Transport ATP-Binding Protein AapP	1,30	1,05	4,22 ND	ND	c
		BMEI1211	General L-Amino Acid-Binding Periplasmic Protein AapJ Precursor	2,05	0,80	ND	2,07	Р
		BMEI1249 BMEI1305	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor Porin	2,34 5.70	1,40 0.88	ND ND	ND ND	IOM
		BMEI1605	Large Conductance Mechanosensitive Channel	2,01	0,86	ND	ND	IIM
		BMEI1716 BMEI1742	Trehalose/Maltose Binding Protein	1,70 1 78	1,11 1 83	ND ND	1,62 ND	C
		BMEI1829	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,00	0,91	ND	ND	IOM
		BMEII0103	Leu/Ile/Val-Binding Protein Precursor	1,59	1,06	ND	1,85	С
		BMEII0340 BMEII0341	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport System Permease Protein LivM High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport System Permease Protein LivH	2,68	1,09	ND ND	ND ND	IIM
		BMEII0342	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivF	2,39	0,85	ND	ND	C
		BMEII0343	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivG	2,00	0,96	ND	ND 2.69	С
		BMEII0344 BMEII0487	Nickel-Binding Periplasmic Protein Precursor	3,40 1,52	0,83	ND	2,00 ND	P
		BMEII0590	Sugar-Binding Protein	6,56	0,77	ND	2,68	С
		BMEII0591 BMEII0592	Sugar Transport System Permease Protein	4,62 3,49	0,93	ND ND	ND ND	C C
		BMEII0593	Glucose ABC Transporter ATPase	1,62	1,05	2,92	ND	c
		BMEII0625	Glycerol-3-Phosphate-Binding Periplasmic Protein Precursor	5,58	0,82			P
		BMEII0702 BMEII0734	Periplasmic Oligopeptide-Binding Protein Precursor	15,92	1,09	ND	1,76	P
		BMEII0735	Periplasmic Oligopeptide-Binding Protein Precursor	5,82	1,05	ND	ND	Р
		BMEII0736	Oligopeptide Transport System Permease Protein OppB	3,72 5.01	1,04	ND ND	ND ND	IIM
		BMEII0738	Oligopeptide Transport ATP-Binding Protein OppD	2,32	1,03	ND	ND	С
		BMEII0755	Sugar-Binding Protein	2,98	1,02	ND	ND	С
		BMEII0783	31 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	1,51 2,21	1,50	ND	ND	IOM
		BMEII0863	Oligopeptide Transport ATP-Binding Protein AppD	0,88	1,08	1,45	ND	IMAA
		BMEII0923 BMEII1052	Spermidine/Putrescine-Binding Periplasmic Protein	1,99 1,65	0,81		1,52 ND	IIM C
		BMEII1120	Iron(Iii)-Binding Periolasmic Protein Precursor	1.68	1.02	ND	ND	IIM
								IIM

			Micro	array	2D-0	DIGE	
Cellular function affected	Target	Protein	Ratio <i>∆vjbR</i> /wt	Ratio ∆ <i>babR /</i> wt	Ratio ∆ <i>vjbR /</i> wt	Ratio ∆ <i>babR /</i> wt	Predicted cellular localisation
Metabolism of cofactors and							
Vitariiiiio	BMEI1157	NADH-Quinone Oxidoreductase Chain B	1.57	1.32	ND	ND	С
	BMEI1158	NADH-Quinone Oxidoreductase Chain A	1,51	1,20	ND	ND	IIM
	BMEI1639	Dihydropyrimidine Dehydrogenase (NADP+)	3,01	1,04	ND	ND	С
	BMEII0589	6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine Synthase	1,56	1,14	ND	ND	С
Nucleotide							
metabolism	BMEI1256	Nucleoside Dinhosphate Kinase	1.48	0.91	ND	ND	Р
	BME11250	Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase	1,40	1.31	ND	1.66	P
	BMEII0232	Uracil Phosphoribosyltransferase	1,49	1,29	ND	ND	IMAA
	BMEII0896	Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase	0,83	0,86	3,26	ND	Р
Replication and							
repair	DME 10077	DNA Direlier Destais III Aleka	4.00	0.05	ND	ND	0
	BIVIEI0877	DNA-Binding Protein HU-Alpha Single Strand Binding Protein	1,63	0,95	ND 2.03		C
	BME11179	Integration Host Factor Alpha-Subunit	1,02	0.88	2,00 ND	ND	C C
	BMEI1794	Integration Host Factor Beta-Subunit	1,47	1,04	ND	ND	č
	BMEI1943	Chromosomal Replication Initiator Protein DnaA	1,47	1,24	ND	ND	IIM
	BMEII0092	Replication Protein B	1,06	0,96	1,45	ND	С
Signal							
Iransduction	PMEU0050	Sanaan Transduction Histiding Kinggo	1.54	0.07	ND	ND	C
Transcription	BINE110050		1,54	0,97	ND	ND	C
Transcription	BMEI0253	Transcriptional Regulator, MarR Family	1.46	1.01	ND	ND	С
	BMEI0423	Response Regulator CtrA	1,56	1,22	ND	ND	c
	BMEI0518	Cold Shock Protein CspA	1,89	1,37	ND	ND	С
	BMEI0626	Transcriptional Regulator, GntR Family / Multiple Substrate Aminotransferase	3,42	1,13	ND	2,64	С
	BMEI1364	Transcriptional Regulatory Protein MucR	1,52	1,39	ND	ND	С
	BMEII0486	Nickel-Responsive Regulator NikR	1,43	0,99	ND	ND	С
Iranslation	PMEIOOFE	L SLI Bibosomol Brotoin L 20D	2.27	1.24	ND	ND	C
	BIVIE10056	LSU Ribosomal Protein L27P	2,27	1,34			C
	BMEI0202	LSU Ribosomal Protein L36P	1,79	1.07	ND	ND	č
	BMEI0322	LSU Ribosomal Protein L31P	1.35	1.02	ND	ND	č
	BMEI0481	LSU Ribosomal Protein L25P	1,58	1,16	ND	0,71	С
	BMEI0742	Protein Translation Elongation Factor Tu (EF-Tu)	1,81	1,30	ND	1,98	С
	BMEI0747	LSU Ribosomal Protein L10P	1,38	1,22	2,37	ND	С
	BMEI0752	SSU Ribosomal Protein S12P	1,75	1,36	ND	ND	С
	BMEI0753	SSU Ribosomal Protein S7P	1,37	1,26	1,93	ND	С
	BMEI0754	Protein Translation Elongation Factor G (EF-G)	1,71	1,28	ND	ND 0.69	C
	BMEI0755	SSI I Ribosomal Protein S10P	1,00	1,22		0,00	C
	BME10758	LSU Ribosomal Protein L4P	1,60	1.05	ND	ND	č
	BMEI0759	LSU Ribosomal Protein L23P	1.78	1.21	ND	ND	č
	BMEI0760	LSU Ribosomal Protein L2P	1,68	0,96	ND	ND	С
	BMEI0761	SSU Ribosomal Protein S19P	1,62	0,98	ND	ND	С
	BMEI0762	LSU Ribosomal Protein L22P	1,65	1,23	ND	ND	С
	BMEI0763	SSU Ribosomal Protein S3P	1,82	1,06	ND	ND	С
	BMEI0764	LSU Ribosomal Protein L16P	1,71	1,14	ND	ND	С
	BIVIEI0765	LSU Ribosomal Protein S17P	1,00	1,17			C
	BMEI0767	I SLI Ribosomal Protein I 14P	2 31	1,20			C
	BMEI0768	LSU Ribosomal Protein L24P	1.52	1.07	ND	ND	č
	BMEI0769	LSU Ribosomal Protein L5P	1,83	1,20	ND	ND	c
	BMEI0770	SSU Ribosomal Protein S14P	1,65	1,09	ND	ND	С
	BMEI0771	SSU Ribosomal Protein S8P	1,77	1,06	ND	ND	С
	BMEI0779	SSU Ribosomal Protein S13P	1,59	1,25	ND	ND	С
	BME10780	SSU Ribosomal Protein S11P	1,54	1,00	ND	0,68	С
	BME10781	DNA-Directed RNA Polymerase Alpha Chain	1,67	1,16	ND	ND	C
	BMEI0926	Ribosome Recycling Factor (RRF)	1,40	1,24			c
	BME10820	Glutamyl Trna Synthase	0.99	0.91	1.64	ND	č
	BMEI0872	Hfg	1,76	1,00	ND	ND	Č
	BMEI1133	SSU Ribosomal Protein S4P	1,86	1,20	ND	ND	С
	BMEI1168	LSU Ribosomal Protein L13P	1,83	1,00	ND	ND	С
	BMEI1169	SSU Ribosomal Protein S9P	1,26	0,99	1,93	ND	С
	BMEI1480	SSU Ribosomal Protein S6P	2,09	1,35	ND	ND	С
	BMEI1481	SSU Ribosomal Protein S18P	1,76	1,27	ND	ND	С
	BMEI1483	LSU Ribosomal Protein L9P	1,45	1,15	ND	0,12	C
	BMEI1071	SSI I Ribosomal Protein S15P	1,50	1,25			C
	BMEII0278	Translation Initiation Inhibitor	1,00	0.91	ND	ND	C C
	BMEII0332	SSU Ribosomal Protein S21P	1.49	1.33	ND	ND	č
	BMEII0661	LSU Ribosomal Protein L33P	2,57	1,08	ND	ND	С
Unassigned							
	BMEI0035	D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase	1,10	1,01	1,42	ND	P
	BMEI0587	ComL, Competence Lipoprotein	1,62	1,06	ND	ND	С
	BMEI0611	Hill Protein	1,36	1,20	ND	ND	IIM
	BIVIEIU830	Ulier membrane Protein	2,39	1,09	0.52		
	BMEI1193	Cell Wall Degradation Protein	1,30	1,23	0.75	ND	c
	BMEI1444	Adenine-Specific Methyltransferase	1.55	1.23	ND	ND	č
	BMEI1501	Transglycosylase Associated Protein	2,20	0,75	ND	ND	IIM
	BMEI1584	Invasion Protein B	2,46	1,21	ND	ND	IIM
	BMEI1859	Integral Membrane Protein	1,40	1,14	ND	ND	IIM
	BMEII0002	Ribosomal-Protein-Serine Acetyltransferase	1,17	1,04	1,40	ND	IIM
	BMEII0017	Ump10	1,47	1,09	ND	ND	IOM
	BMEII0431	19 kDa Perinlasmic Protein	0,89	0,87	1,40 ND		P
1	DWIL10000	To Real onplasmic Fotom	1,+/	1,10			C .

				Miore	Fold Cha	inge ratio		
	Cellular function affected	Target	Protein	Ratio ∆vjbR /wt	Ratio ∆babR /wt	ZD-L Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Predicted cellular localisation
Class II : Actvated by VjbR	Amino Acid							
	metabolism	BMEI0101	Cysteine Synthase A	1,05	1,37	0,68	ND	С
		BMEI0522 BMEI1271	Carbamoyl Phosphate Synthase Large Subunit 2-Isopropylmalate Synthase	1,11 0,64	1,04 1,00	0,60 ND	ND ND	C C
		BMEI1378 BMEII0908	L-Asparaginase II Glutaminase	0,67 0,61	0,75 1,24	ND ND	ND ND	C C
	Biodegradation of	BMEII0910	Glutamate Decarboxylase Beta	0,63	1,17	ND	ND	С
	xenobiotics	BMEI0024	L-Sorbosone Dehydrogenase, NAD(P) Dependent	0,63	0,86	ND	ND	С
	Carbohydrate	BIVIEI 1034		0,70	0,65	ND	ND	C
	Cell motility	BMEII0485	D-Galactarate Dehydratase	0,67	0,80	ND	ND	С
	Energy	BMEII0170	Flagellar Protein FlgJ	0,59	0,83	ND	ND	IIM
	metabolism	BMEI1525	Helix-Turn-Helix Protein, CopG Family	0,62	0,98	ND	ND	С
		BMEI1898 BMEI1899	Cytochrome O Ubiquinol Oxidase Operon Protein CyoD Cytochrome O Ubiquinol Oxidase Subunit III	0,52 0.48	1,06	ND ND	ND ND	IIM
		BMEI1900 BMEII0760	Cytochrome O Ubiquinol Oxidase Subunit I	0,45	1,18	ND	ND	IIM
		BMEII0700 BMEII0952	Nitrate Reductase Delta Chain	0,70	0,98	ND	ND	IMAA
	Folding, sorting	BINE110909		0,70	0,80	ND	ND	F
		BMEI0102 BMEI0815	Universal Stress Protein Family Protein Via	0,71	0,99	ND	ND	C
		BMEI1510	Cold Shock Protein CspA	0,26	1,05	ND	ND	c
		BMEII0025	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog	0,73	1,12	ND	ND	P
		BMEII0026 BMEII0027	Attachment Mediating Protein VirB2 Homolog Channel Protein VirB3 Homolog	0,11 0,15	1,57 1,56	ND ND	ND ND	IIM IIM
		BMEII0028 BMEII0029	ATPase VirB4 Homolog Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog	0,33 0,26	1,56 1,37	ND ND	ND ND	C P
		BMEII0030 BMEII0032	Channel Protein VirB6 Homolog Channel Protein VirB8 Homolog	0,61 0,50	1,26 1,55	ND 0,26	ND ND	IIM C
		BMEII0033 BMEII0034	Channel Protein VirB9 Homolog Channel Protein VirB10 Homolog	0,72 0.65	1,58 1,29	0,49 2.10	ND ND	C C
		BMEII0245 BMEII1047	Universal Stress Protein Family 10 kDa Chaperonin GroES	0,48	1,32 2,95	ND ND	ND ND	C C
	Glycan	BMEII1048	60 kDa Chaperonin GroEL	0,35	3,19	ND	0,63	c
	biosynthesis	BMEI0356	Type 1 Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein J	0.58	1.10	ND	ND	IIM
		BMEI0727 BMEI1435	D-AlanineD-Alanine Ligase A Polysaccharide Deacetylase	0,60	1,28 1,22	ND 0.37	1,71 ND	P C
	Hypothetical	BMEII1028	Tetraacyldisaccharide 4'-Kinase	0,88	0,95	0,52	ND	C
	Hypothetiour	BMEI0030 BMEI0051	Hypothetical Cytosolic Protein	0,25	1,10	ND ND	ND ND	C
		BMEI0172	Hypothetical Protein	0,54	0,89	ND	ND	C
		BMEI0193 BMEI0367	Hypothetical Protein	0,56	0,92	ND	ND	C
		BMEI0515 BMEI0602	Hypothetical Protein Hypothetical Protein	0,35 0,60	0,90 1,09	ND ND	ND ND	C
		BMEI0822 BMEI1072	Hypothetical Protein Hypothetical Protein	0,62 0,12	1,16 0,89	ND ND	ND ND	C C
		BMEI1508 BMEI1509	Putative Lipoprotein Hypothetical Protein	0,63 0,41	1,09 1,26	ND ND	ND ND	C C
		BMEI1792 BMEI1842	Hypothetical Protein Putative Membrane Protein	0,61 0.31	0,94 1.05	ND ND	ND ND	IIM OMAA
		BMEII0171 BMEII0379	Hypothetical Cytosolic Protein Hypothetical Protein	0,59	0,79 0.90	ND ND	ND ND	C
		BMEII0454	Hypothetical Protein	0,60	0,85	ND	ND	OMAA
		BMEII0505	Hypothetical Protein	0,57	1,13	ND	ND	IIM
		BMEII1050 BMEII1102	Hypothetical Protein	0,70	1,16	ND	ND	ІМ
	Lipid metabolism	PMEII1103	Phoephatidulalucerophoephatase R	0.50	1 29	ND	ND	IIM
	Membrane transport	DWLITTUS		0,50	1,50			mvi
		BMEI0469 BMEI0605	Purine Nucleoside Permease Bicyclomycin Resistance Protein	0,45	1,35	0,18 ND	ND ND	P
		BMEI0606	Bicyclomycin Resistance Protein Homolog	0,69	1,00	ND	ND	IIM
		BME11841 BME11912	Sugar Transporter	0,64	1,02	ND	ND	
		BMEI1934 BMEII0105	Ireripiasmic Oligopeptide-Binding Protein Precursor Iron-Regulated Outer Membrane Protein FrpB	0,65 1,06	1,05 1,15	ND 0,81	ND ND	IOM
		BMEII0517 BMEII0633	Branched-Chain Amino Acid Transport Protein AzlC Leucine-, Isoleucine-, Valine-, Threonine-, And Alanine-Binding Protein Precursor	0,64 0,64	1,51 0,78	ND ND	ND ND	IIM P
		BMEII0909	Glutamate/Gamma-Aminobutyrate Antiporter	0,63	1,42	ND	ND	IIM

				Micro	Fold Cha arrav	inge ratio 2D-I	DIGE	
	Cellular function affected	Target	Protein	Ratio <i>∆vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆ <i>babR /</i> wt	Predicted cellular
	Metabolism of cofactors and vitamins							localication
	Nucleotide	BME10559	5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase	0,71	0,95	ND	ND	С
	metabolism	BMEI1127 BMEII1009	Phosphoribosylformylglycinamidine Synthase C-Di-GMP Phosphodiesterase A	0,95 0,49	1,07 0,82	0,83 ND	ND ND	C P
	Replication and repair							
	Signal	BMEII0713	Transposase	0,66	0,91	ND	ND	С
	transduction	DME IO 447	0.4.0	0.01	1.00	0.70	ND	-
	Transcription	BMEI0417 BMEII0853	Two Component Response Regulator	0,91 0,68	0,90	0,70 ND	ND	c
	riditeonption	BME10558	Transcriptional Regulator ArsR	1,05	1,13	0,68	ND	С
		BME10808	Transcriptional Regulator, Merk Pamily Transcriptional Regulator, GntR Family	0,73	0,84 0,82	0,73 ND	ND	c
		BMEI1094 BMEI1758	Exopolysaccharide Production Negative Regulator Precursor Transcriptional Activator, LuxB Family	0,61	0,94	ND ND	ND ND	P
	_	BMEII0311	Transcriptional Regulator, MarR Family	0,54	1,06	ND	ND	C
	Iranslation	BMEI0741	23S RNA Methyltransferase	1,04	1,01	0,68	ND	С
		BMEI1047	Tyrosyl tRNA Synthase	1,23	1,07	0,68	ND	C
	Unassigned	DIMETIZOT		1,05	1,00	0,40	ND	U
		BMEI0536 BMEI1504	Periplasmic Immunogenic Protein Acetylspermidine Deacetylase	0,65 0,59	1,33 0,91	ND ND	ND ND	P C
		BMEI1864	Pterin-4-Alpha-Carbinolamine Dehydratase	0,56	1,05	ND	ND	C
		BMEI1873 BMEII1070	Adhesin AIDA-I	0,52	0,99 0,85	ND	ND	юм
Class III : Repressed								
by BabR	Amino Acid							
	metabolism	BMEI1196	EnoylCoA Hydratase	1,08	1,00	ND	1,51	С
		BMEI2029	Adenosylhomocysteinase	1,74	1,47	ND	ND	C
		BMEII0371	ß-Alanine Pyruvate Transaminase	1,97	0,97	ND	1,74	c
	Biodegradation of xenobiotics							
		BMEI1367	Superoxide Dismutase Mn	1,79	1,12	ND	1,38	С
		BME11740 BME11747	Aldehyde Dehydrogenase	2,37	1,98	ND	ND	C
	Carbohydrate	BMEI1819	Alcohol Dehydrogenase	1,35	1,05	ND	1,44	С
	metabolism	BMEI0223	Membrane Bound Lytic Murein Transglycolase	1.62	1.15	ND	1.38	С
		BMEI0310	Glyceraldehyde 3-Phosphate Deshydrogenase	1,49	1,12	ND	1,44	C
		BME10851 BME11779	Fructokinase	1,62	0,92 0,97	ND	1,62	c
		BMEII0248 BMEII0358	Phosphoglycerate Mutase 2-Dehydro-3-Deoxyphosphogalactonate Aldolase	1,22 0.93	1,05 0.94	ND ND	1,74 1.38	C C
	Cell Growth and		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	.,	.,.			
	Geath	BME10343	Cell Division Protein FtsH	1,31	1,41	ND	ND	IIM
	metabolism							
		BMEI0096 BMEI0138	Electron Transfer Flavoprotein Beta Subunit Succinyl CoA Synthetase Beta Chain	1,00	0,89 0.77	ND ND	1,54 1,91	C C
	Folding conting	BME10487	ATP Synthase Beta Subunit/Transription Termination Factor Rho	0,96	1,01	ND	1,61	c
	and degradation							_
		BMEI0123 BMEI0195	Peptidyl-Prolyl Cis- I rans Isomerase ATP-Dependent Clp Protease, ATP-Binding Subunit ClpB	1,06 1,26	0,97 1,57	ND ND	1,52 0,74	P IMAA
		BMEI0613	Protease DO ATP-Dependent Cln Protease ATP-Binding Subunit ClnA	0,73	1,01		1,66 ND	P
		BME10876	ATP-Dependent Protease La	1,17	1,62	ND	ND	č
		BMEI0934 BMEI2002	ATP Dependant RNA Helicase DnaK Protein	0,94 1,10	1,37 1,63	ND ND	0,71 1,78	C C
		BMEII0025	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog	0,15	1,44	ND	ND	P
		BMEII0026 BMEII0027	Channel Protein VirB3 Homolog	0,11	1,57	ND ND	ND ND	IM
		BMEII0028	ATPase VirB4 Homolog Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog	0,33	1,56 1,37	ND ND		C
		BMEII0032	Channel Protein VirB8 Homolog	0,50	1,55	0,26	ND	c
		BMEII0033 BMEII0401	Channel Protein VIR9 Homolog Thioredoxine	0,72 0,96	1,58 1,00	0,49 ND	ND 1,71	C C
		BMEII1047 BMEII1048	10 kDa Chaperonin GroES 60 kDa Chaperonin GroEL	0,49 0,35	2,95 3,19	ND ND	ND 0.63	с с
	Glycan			5,00	5,15		5,00	Ŭ.
	biosynuicois	BMEI0727 BMEI1404	D-Alanine-D-Alanine Ligase A Mannosyltransferase	0,60	1,28	ND	1,71	C
	Hypothetical	5101211404		1,05	0,52		1,50	-
		BMEI0368 BMEI0369	Hypothetical Protein Hypothetical Protein	1,21 1,36	1,39 1,32	ND ND	ND ND	C P
		BMEI1201	Hypoyhetical Cytosolic Protein	1,08	1,05	ND	2,64	С
		BMEI1479 BMEI1866	Hypothetical Protein	2,15	1,46	ND ND	ND ND	C
		BMEII0516	Hypothetical Protein	0,57	1,41	ND	ND	IIM

	Cellular function affected	Target	Identity/similarity/function	Transrciptional ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Transrciptional ratio ∆babR /wt	Translational ratio ∆vjbR/wt	Translational ratio ∆babR/wt	Predicted cellular localisation
	Glycan							localication
	biosynthesis	BMEI0727	D-Alanine-D-Alanine Ligase A	0.60	1 28	ND	1 71	C
		BMEI1404	Mannosyltransferase	1,09	0,92	ND	1,38	č
	Hypothetical							
		BMEI0368	Hypothetical Protein	1,21	1,39	ND	ND	С
		BMEI0369	Hypothetical Protein Hypothetical Cytosolic Protein	1,30	1,32		ND 2.64	P C
		BMEI1479	Hypothetical Protein	2,15	1,46	ND	ND	č
		BMEI1866	Hypothetical Protein	1,48	1,31	ND	ND	С
	Lipid	BMEII0516	Hypothetical Protein	0,57	1,41	ND	ND	IIM
	metabolism							
		BMEI1112	3-Oxo-Acyl-Carrier Protein Synthase	0,89	0,93	ND	1,65	С
	Mombrano	BMEII1103	Phosphatidylglycerophosphatase B	0,50	1,38	ND	ND	IIM
	transport							
		BMEI0469	Purine Nucleoside Permease	0,45	1,35	0,18	ND	Р
		BMEI1211	General L-Amino Acid-Binding Periplasmic Protein AapJ Precursor	2,05	0,80	ND	2,70	P
		BMEI1249 BMEI1716	Z5 KDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor Trebalose Maltose Binding Protein	2,34	1,40		ND 1.62	IOM C
		BMEI1930	Leucine-, Isoleucine-, Valine-, Threonine-, And Alanine-Binding Protein Precursor	1,45	0,91	ND	1,61	P
		BMEII0098	High Affiny Branched Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivF	0,84	0,93	ND	1,38	С
		BMEII0103	Leu Ile Val Binding Protein Pranched Chain Amine Acid APC Transporter Pariplasmic Rinding Protein	1,59	1,06	ND	1,85	C
		BMEII0544	Branched-Chain Amino Acid Transport Protein AziC	0.63	1.51	ND	2,08 ND	IIM
		BMEII0590	Sugar Binding Protein	6,56	0,77	ND	2,68	С
		BMEII0593	ATP GDP Binding Protein ABC Transporter	1,62	1,05	ND	1,93	С
		BMEII0601	Cysteine Binding Periplasmic Protein Periplasmic Oligopentide Binding Protein Precursor	1,12	1,01	ND ND	1,38	C
		BMEII0734	Na(+)-Linked D-Alanine Glycine Permease	1.50	1,05	ND	ND	IIM
		BMEII0909	Glutamate/Gamma-Aminobutyrate Antiporter	0,63	1,42	ND	ND	IIM
		BMEII0923	Spermidine/Putrescine-Binding Protein	1,99	0,77	ND	1,52	Р
	Metabolism of cofactors and							
	vitamins							
		BMEI0859	Lipoic Acid Synthetase	1,30	1,23	ND	1,23	С
		BMEI 1643	Aminomethyltransferase	1,20	0,77		1,62	C C
	Nucleotide	Dillenoooo		1,00	1,00		1,00	Ū
	metabolism	D. 4510770		4.00	0.07	ND	1.00	0
		BMEI0778	Adenyiate Kinase Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase	1,28	0,97		1,38	C
	Replication and	DIVIENTOOT		1,00	1,20	, ND	1,00	Ũ
	repair	DIALE				ND	1.00	0
	Translation	BMEI0780	DNA Directed RNA Polymerase Alpha Chain	1,54	1,24	ND	1,93	C
	Translation	BMEI0742	EF-Tu	1,81	1,30	ND	1,98	С
		BMEI1480	SSU Ribosomal Protein S6P	2,09	1,35	ND	ND	С
		BMEI1915	SSU Ribosomal Protein S1P	1,26	1,46	ND	1,77	C
	Transcription	DIVICIOUS		0,50	1,00		ND	U
		BMEI0518	Cold Shock Protein CspA	1,02	1,37	ND	ND	С
		BMEI0532	RNA Polymerase Sigma Factor RpoD	0,92	1,42	ND	ND 2.64	C
		BMEI1364	Transcriptional Regulator Grite Familiy	3,42	1,13	ND ND	2,64 ND	C C
		BMEII1116	Transcriptional Activator, LuxR Family	-	1,44	ND	0,55	c
	Unassigned							
		BMEI0406	/-Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase	1,04	1,14	ND ND	1,38 ND	C
		BMEI0934	ATP Dependant RNA Helicase	0,94	1,37	ND	0,71	c
Class IV : Activated								
oy Dabix	Amino Acid metabolism							
		BMEI0219	Malonate-Semialdehyde Dehydrogenase (Acylating) / Methylmalonate-Semialdehyde	3,27	0,67	ND	0,51	С
		BMEI0231	NAD Specific Glutamate Dehydrogensase	1,41	1,11	ND	0,37	С
		BMEI0451	2-isopropyi walate Synthase Isocitrate Deshydrogenase	0,95	1,11		0,21 0,68	C C
		BMEI0811	L-Serine Dehydratase	0,78	1,02	ND	0,66	č
		BMEI0979	Glutamine Synthase	1,18	1,26	ND	0,30	С
		BMEI1620	Ornithine Carbamoyltransferase	1,00	1,20	ND	0,64	C
		BMEI1939	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	0,81	0,97	ND	0,60	c

				Fold Change ratio				
	Cellular function affected	Target	Protein	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Ratio ∆ <i>vjbR</i> /wt	Ratio ∆babR /wt	Predicted cellular localisation
	Lipid metabolism							
	Membrane	BMEI1112 BMEII1103	3-Oxo-Acyl-Carrier Protein Synthase Phosphatidylglycerophosphatase B	0,89 0,50	0,93 1,38	ND ND	1,65 ND	C IIM
	Metcholiom of	BME10469 BME11211 BME11249 BME11716 BME11030 BME11030 BME110503 BME110593 BME110593 BME110783 BME110909 BME110923	Purine Nucleoside Permease General L-Amino Acid-Binding Periplasmic Protein AapJ Precursor 25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor Trehalose Maltose Binding Protein Leucine-, Isoleucine-, Valine-, Threonine-, And Alanine-Binding Protein Precursor High Affiny Branched Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivF Leu Ile Val Binding Protein Branched Chain Amino Acid ABC Transporter Pariplasmic Binding Protein Branched-Chain Amino Acid Transport Protein AzIC Sugar Binding Protein ATP GDP Binding Protein ABC Transporter Cysteine Binding Periplasmic Protein Periplasmic Oligopeptide Binding Protein Precursor Na(+)-Linked D-Alanine Glycine Permease Glutamate/Gamma-Aminobutyrate Antiporter Spermidine/Putrescine-Binding Protein	0,45 2,05 2,34 1,70 1,45 0,84 1,59 3,40 0,63 6,56 1,62 1,12 15,92 1,50 0,63 1,99	$\begin{array}{c} 1,35\\ 0,80\\ 1,40\\ 1,10\\ 0,91\\ 0,93\\ 1,06\\ 0,83\\ 1,51\\ 0,77\\ 1,05\\ 1,05\\ 1,05\\ 1,05\\ 1,50\\ 1,42\\ 0,77\end{array}$	0,18 ND ND ND ND ND ND ND ND ND ND ND ND ND	ND 2,70 ND 1,62 1,61 1,38 2,68 ND 2,68 1,93 1,38 1,76 ND 1,52	P P IOM C P C C P IIM C C C C IIM IIM P
	cofactors and vitamins	BME10859	Lipoic Acid Synthetase	1,30	1,23	ND	1,23	С
	Nucleotide	BMEI1643 BMEII0559	N Carbamoyl L Amino Acid Amidohydrolase Aminomethyltransferase	1,26 1,03	0,77 1,03	ND ND	1,62 1,68	C C
	metabolism	BMEI0778 BMEI1961	Adenylate Kinase Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase	1,28 1,63	0,97 1,28	ND ND	1,38 1,66	C C
	repair	BME10780	DNA Directed RNA Polymerase Alpha Chain	1,54	1,24	ND	1,93	С
	Iranslation	BMEI0742 BMEI1480 BMEI1915 BMEII0332	EF-Tu SSU Ribosomal Protein S6P SSU Ribosomal Protein S1P SSU Ribosomal Protein S21P	1,81 2,09 1,26 0,50	1,30 1,35 1,46 1,33	ND ND ND ND	1,98 ND 1,77 ND	C C C C
	Transcription	DMEIOFAO	Oshi Okash Dashis Osa	4.00	4.07	ND	ND	-
		BMEI0518 BMEI0532 BMEI0626 BMEI1364 BMEII1116	Cold Shock Protein CspA RNA Polymerase Sigma Factor RpoD Transcriptional Regulator GntR Familly Transcriptional Regulatory Protein MucR Transcriptional Activator, LuxR Family	1,02 0,92 3,42 1,51 -	1,37 1,42 1,13 1,39 1,44	ND ND ND ND ND	ND ND 2,64 ND 0,55	С С С С С
	Unassigned	DME10406	7 Alaba Hudrawataraid Dahudraganaga	1.04	1 1 4	ND	1 20	C
Class IV : Activated by		BMEI0400 BMEI0536 BMEI0934	Periplasmic Immunogenic Protein ATP Dependant RNA Helicase	0,65 0,94	1,14 1,33 1,37	ND ND ND	ND 0,71	P C
Dabix	Amino Acid metabolism	DMEI0040		0.07	0.07	ND	0.54	
		BME10219 BME10231 BME10451 BME10791 BME10811 BME10979 BME11620 BME11638 BME11939	Malonate-Semialdenyde Denydrogenase (Acylating) NAD Specific Glutamate Dehydrogensase 2-Isopropyl Malate Synthase Isocitrate Deshydrogenase L-Serine Dehydratase Glutamine Synthase Omithine Carbamoyltransferase Glutamate Synthase D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	3,27 1,41 0,95 1,54 0,78 1,18 1,00 2,31 0,81	0,67 1,11 1,11 1,05 1,02 1,26 1,20 0,74 0,97	ND ND ND ND ND ND ND ND	0,51 0,37 0,21 0,68 0,66 0,30 0,64 2,21 0,60	C C C C C C C C C C C
	xenobiotics	BMEI1588 BMEI1707	Carboxynorspermidine Synthase Mandelate Racemase	1,06 0,98	1,12 1,02	ND ND	0,72 0,13	C C
	Biosynthsesis of secondary metabolites	BMEI1740	Aldehyde Dehydrogenase	0,99	0,89	ND	0,66	С
	Carbohydrate metabolism	BMEI0516	Aspartate Aminotransferase	1,47	1,20	ND	0,68	С
		BMEI0836 BMEI1413 BMEII0511	Citrate Synthase GDP-Mannose 4,6-Dehydratase Phosphogluconate Dehydratase	1,63 1,56 0,91	1,09 0,99 0,95	ND ND ND	0,56 0,68 0,08	C P C
	metabolism	DAGE	August Dibuteran	1.05			0.15	
		BMEI0161 BMEI0162 BMEI0249 BMEI1320 BMEI1436	Succinate Dehydrogenase Succinate Dehydrogenase Iron-Sulfur Protein ATP Synthase Alpha Chain Electron Transfer Flavoprotein-Ubiquinone Oxidoreductase Precursor Pyruvate Phosphatase Dikinase	1,29 1,23 2,09 0,92 1,05	1,13 0,94 1,25 0,91 1,10	ND ND ND ND ND	0,16 0,61 0,76 0,51 0,47	C C IIM C
	Folding, sorting and degradation	BMEI1035	ATP-Dependent RNA Helicase Dead	1,30	1,13	1,50 ND	0,78	С
		BMEII0350	D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase	0,95	0,87	ND	0,76	C
	Hypothetical	BMEI0628 BMEI1215 BMEII0538	Hypothetical Protein Hypothetical Membrane Spanning Protein Hypothetical Protein	1,01 1,13 0.94	1,16 0,70 0.64	ND ND ND	0,72 ND ND	C SFP C

			Fold Change ratio				
			Microarray 2D-DIGE				
Cellular function affected	Target	Protein	Ratio ∆ <i>vjbR /</i> wt	Ratio ∆babR /wt	Ratio <i>∆vjbR /</i> wt	Ratio ∆ <i>babR /</i> wt	Predicted cellular localisation
Lipid metabolism							
	BMEI0543	Choloylglycine Hydrolase	1,58	0,95	ND	0,11	IIM
	BMEI1250	3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier Protein) Reductase	0,94	0,95	ND	0,75	С
	BMEI1512	Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase	1,84	1,09	ND	0,74	С
Membrane transport							
	BMEI0668	Calcium Binding Protein	5,77	0,59	ND	ND	Р
	BMEI0868	NtrX	0,99	1,05	ND	0,74	С
	BMEI1416	O-Antigen Export System ATP-Binding Protein RfbB	0,96	0,97	ND	0,74	IIM
Metabolism of							
cofactors and vitamins							
	BMEI0176	Porphobilinogene Deaminase	1,11	1,03	ND	0,13	С
	BMEI0712	CbiG Protein / Precorrin-3B C17-Methyltransferase	0,98	1,07	ND	0,08	IIM
	BMEI1759	5-MethyltetrahydrofolateHomocysteine Methyltransferase	0,77	1,20	ND	0,75	С
Replication and repair							
	BMEI0588	DNA Repair Protein RecN	1,00	0,99	ND	0,21	С
	BMEI0749	DNA-Directed RNA Polymerase Beta Chain	1,10	1,20	ND	0,30	С
	BMEI1823	DNA Gyrase B	0,80	1,20	ND	0,60	С
	BMEII0676	DNA Gyrase Subunit B	1,00	1,04	ND	0,57	С
Transcription							
	BMEI0095	Succinoglycan Biosynthesis Regulator	0,97	0,94	ND	0,74	С
	BMEI0352	Hypothetical Transcription Regulator	1,11	0,89	ND	0,36	IOM
	BMEI0749	DNA-Directed RNA Polymerase Beta Chain	1,10	1,20	ND	0,30	С
	BMEII0299	Transcriptional Regulator, IcIR Family	0,87	0,96	ND	0,74	С
Translation							
	BMEI0481	LSU Ribosomal Protein L25P	1,58	1,16	ND	0,71	С
	BMEI0755	EF-Tu	1,85	1,15	ND	0,68	С
	BMEI0823	SSU Ribosomal Protein S2P	1,27	1,14	ND	0,75	С
	BMEI1287	Ribonuclease III	0,84	1,09	ND	0,74	С
	BMEI1451	Processing Peptidase	1,56	1,24	ND	0,13	С
	BMEI1483	LSU Ribosomal Protein L9P	1,45	1,15	ND	0,12	С
Unassigned							
	BMEI0796	31 kDa Immunogenic Protein	0,89	0,97	ND	0,44	Р
	BMEII0413	Citrate Lyase B	1,04	1,02	ND	0,73	С

ORF number	Forward Primer	Reverse Primer
BMEI0030	ATCAGGAGAGTCGGTGAAAGG	GACGCTTTTACAATTCGTACGTC
BMEI0668	CACAAGGGCCATCATGAGAT	TGTTTTCATTGGGCCCTTAT
BMEI1007	ATCGATGGATGCCATACATTG	TCTCTATACCGTCCGTGAGTGAA
BMEI1305	CGGCTACATGCCTGACGT	GAGTCATAGGCAACAACACCAG
BMEI1758	CCCTGAATGGCTCCTTGAA	CATAGTTTTGTGCCAAGTATCTCTG
BMEI2002	GGTCATTGAAAATGCAGAAGGT	TGACCAGCGAGGCGTT
BMEII0025	TCTCTGAGAAGGAGACGATCCTAT	ATAGTCTGAGGTGCAACAGTCG
BMEII0026	ATCGTAATTCTGTTCTTGTCGATCT	GCCTTACAGGCGCGTTC
BMEII0027	AGCTTAAATATGGTTTCCACCG	GATTTGTCTTGCTGACTGCATT
BMEII0028	CAATCGAGCCTAACCTGGC	TTAGCAAGTCCAGCACTTTTTG
BMEII0590	GATGCGGTTGTTCTTTCATTC	ATCGCTGCCCAGTGCTT
BMEII0734	GATCCCAGGTTATTCCATGGTT	ATGTCGTCGAAATAGTCGAGC
BMEII1047	GTTCTGTTCGGCAAGTGGTC	CCCAGAATGTCGGATTCCT
BMEII1048	AGACGCCTACATCCTTCTGC	GTCTGGACGACAGCTTCGA
BMEII1116	CAAGCTGAACTGTTCCAATCG	TGCTGTACCTCGGGCATATC

Supplementary table 2: Oligonucleotides sequences used for real-time PCR analysis.

# Matériel supplémentaire :

**Table suppplémentaire 1 :** Cibles les plus fortement régulées par VjbR mises en évidence par les expériences de microarray. (Fold Change = mRNA  $\Delta v j b R / mRNA$ wt)

	Target gene	Protein	Fold Change
	BMEII0734	Periplasmic Oligopeptide-Binding Protein Precursor	15,9
Fold Change >6	BMEI1026	Long-Chain Fatty Acid Transport Protein	6,7
, in the second se	BMEI10590	Sugar-Binding Protein 25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	6,6
	BMEII0735	Periplasmic Oligopeptide-Binding Protein Precursor	5,8
	BMEI0668	Calcium Binding Protein	5,8
4 <fold change<6<="" td=""><td>BMEI1305</td><td>Porin</td><td>5,7</td></fold>	BMEI1305	Porin	5,7
	BMEII0625	Glycerol-3-Phosphate-Binding Periplasmic Protein Precursor	5,6
	BMEII0737	Uligopeptide Transport System Permease Protein OppC	5,0
	BMEII0736	Oligopeptide Transport System Permease Protein OppB	3.7
	BMEII0592	Sugar Transport System Permease Protein	3,5
	BMEI0626	Transcriptional Regulator, GntR Family / Multiple Substrate Aminotransferase	3,4
3 <fold change<4<="" td=""><td>BMEII0344</td><td>Branched-Chain Amino Acid ABC Transporter, Periplasmic Amino Acid- Binding Protein</td><td>3,4</td></fold>	BMEII0344	Branched-Chain Amino Acid ABC Transporter, Periplasmic Amino Acid- Binding Protein	3,4
J	BMEI0219	Malonate-Semialdehyde Dehydrogenase (Acylating)	3,3
	BME11923	Dibydropyrimidine Debydrogenase (NADP+)	3.0
	BMEII0755	Sugar-Binding Protein	3,0
	BMEI0076	Inorganic Pyrophosphatase	2,9
	BMEII0748	2-Oxoisovalerate Dehydrogenase Alpha Subunit	2,8
	BMEI1494	Hypothetical Protein	2,7
	BMEII0340	High-Aminity Branched-Chain Amino Acid Transport System Permease Protein Livin Hypothetical Protein	2,7
	BMEII0421	Hypothetical Protein	2.6
	BMEII0661	LSU Ribosomal Protein L33P	2,6
	BMEII0774	Hypothetical Protein	2,5
	BMEI1584	Invasion Protein B	2,5
	BMEI0830	Utter Memorane Protein	2,4
	BMEI1747	Aldehvde Dehvdrogenase	2,4
	BMEI0607	Hypothetical Cytosolic Protein	2,4
	BMEI1249	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,3
	BMEII0341	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport System Permease Protein LivH	2,3
	BMEII0738	Oligopeptide Transport ATP-Binding Protein OppD	2,3
	BMEI0767	Giuldifiale Synuidse (NADPH) Sindii Gildin I SLI Ribosomal Protein I 14P	2,3
	BMEI0056	LSU Ribosomal Protein L28P	2,3
	BMEI0263	Leucine-, Isoleucine-, Valine-, Threonine-, And Alanine-Binding Protein Precursor	2,3
	BMEI0474	Cytochrome B	2,3
Fold Charges 2	BMEII0733	Hypothetical Protein	2,2
Fold Change>2	BMEI1998	Hypothetical Cytosolic Protein 31 kDa Outer Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,2
	BMEI1501	Transglycosylase Associated Protein	2,2
	BMEI0542	Hypothetical Protein	2,2
	BMEI2022	Thioredoxin C-1	2,2
	BMEI1479	Hypothetical Protein	2,1
	BMEI0340	Peptidoglycan-Associated Lipoprotein	2,1
	BMEI1480	SSI I Ribosomal Protein S6P	2,1
	BMEI0249	ATP Synthase Alpha Chain	2,1
	BMEI1564	Cytochrome C Oxidase Polypeptide I Homolog, Bacteroid	2,1
	BMEI1545	ATP Synthase C Chain	2,1
	BMEII0746	Lipoamide Acyltransferase	2,1
	BMEI10816	3-OX08CyI-(ACyI-Carrier Protein) Reductase General L. Amino, Acid, Binding Periplasmic Protein, App I. Precursor	2,1
	BMEI1246	Hypothetical Cytosolic Protein	2,0
	BMEI0433	Periplasmic Dipeptide Transport Protein Precursor	2,0
	BMEI1757	Omega-Amino Acid-Pyruvate Aminotransferase	2,0
	BMEI1605	Large Conductance Mechanosensitive Channel	2,0
	BMEI0721	Ustochrome U Ustaase Polypeptiae I Hynothetical Cytosolic Protein	2,0
	BMEI1829	25 kDa Outer-Membrane Immunogenic Protein Precursor	2,0
	BMEII0343	High-Affinity Branched-Chain Amino Acid Transport ATP-Binding Protein LivG	2,0
	BMEII0032	Channel Protein VirB8 Homolog	-2,0
	BMEII1103	Phosphatidylglycerophosphatase B	-2,0
	BMEII1009	C-DI-GMP Phosphodiesterase A	-2,0
	BMEI1899	Cytochrome O Ubiguinol Oxidase Subunit III	-2,0
Fold Change > -2	BMEII0245	Universal Stress Protein Family	-2,1
	BMEI1900	Cytochrome O Ubiquinol Oxidase Subunit I	-2,2
	BMEI0469	Purine Nucleoside Permease	-2,2
	BMEI1509	Hypothetical Protein	-2,5
	BMEI0515	Hypothetical Protein	-2,0
	BMEII0028	ATPase VirB4 Homolog	-3,1
	BMEI1842	Putative Membrane Protein	-3,2
-2 >Fold Change > -4	BMEI1510	Cold Shock Protein CspA	-3,8
	BMEII0029	Attachment Mediating Protein VirB5 Homolog	-3,9
	BMEII0030	Channel Protein VirB3 Homolog	-4,0
Fold Change of	BMEII0025	Attachment Mediating Protein VirB1 Homolog	-6,7
Fold Change < -6	BMEI1072	Hypothetical Protein	-8,6
	BMEII0026	Attachment Mediating Protein VirB2 Homolog	-9,1

Nous avons mis en évidence lors de ce travail que l'abondance de l'ARNm de nombreuses cibles (296) est sous le contrôle (direct ou indirect) de VjbR. Le tableau ci-dessus reprend les cibles dont l'ARNm est augmenté ou diminué d'au moins deux fois dans le mutant  $\Delta v j b R$ . Si seules 83 cibles correspondent à ces critères, on observe parmi elles de très nombreux gènes codant pour des transporteurs, ainsi que des gènes codant pour des cytochromes, des protéines ribosomales ou bien encore des chaperones telles GroES et GroEL. Cette observation conforte donc les résultats exposés dans la deuxième partie de cette thèse.

D'autre part, il a été montré que les régulateurs influançant l'expression d'un grand nombre de gènes agissent le plus souvent comme coordinanteurs de l'expression de gènes appartenant à différentes voies. Ces voies restent donc généralement fonctionelles lorsque ces régulateurs sont mutés. Cependant, elles se trouvent desorganisées. Les régulateurs controllant l'expression d'un plus petit nombre de gènes sont quant à eux souvent plus spécialisés et un plus grand nombre d'entre eux est essentiel (Yu and Gerstein et al., 2006). Nous proposons que VjbR puisse faire partie de la première catégorie de régulateurs, ce qui expliquerait entre autres qu'il ai une forte influence sur l'expression d'un petit nombre de gènes. Sont action plus mesurée sur l'expression d'un grand nombre de ses cibles serait en accord avec l'hypothèse d'un rôle de coordinateur ainsi qu'avec le principe même de QS.

# Díscussion & perspectives

## **IV** Discussion et perspectives

La régulation de l'opéron *virB*, facteur de virulence majeur de *B. melitensis*, par le régulateur de type LuxR, VjbR, et par les  $C_{12}$ -HSL a soulevé de nombreuses questions quand au rôle et à l'organisation d'un système de communication chez cette bactérie intracellulaire. Le but de ce travail était d'une part de mettre en évidence un lien direct entre VjbR et les  $C_{12}$ -HSL, et d'autre part d'aborder le rôle de VjbR en mettant en évidence de nouvelles cibles (directes et indirectes) de ce régulateur. Nous discuterons des résultats obtenus ainsi que des perspectives de ce travail dans les prochains paragraphes.

## IV.1 VjbR, récepteur des C<sub>12</sub>-HSL

Il a précédemment été montré que VjbR est nécessaire à l'activation de l'opéron *virB* et du gène flagellaire *fliF* (Delrue *et al.*, 2005). L'ajout exogène de  $C_{12}$ -HSL a quant à lui un effet répresseur sur l'expression des ces gènes. De part la présence dans le domaine N-terminal de VjbR de résidus impliqués dans la liaison des AHLs conservés chez plusieurs régulateurs LuxR, il a été proposé que ce régulateur serait responsable de l'effet des  $C_{12}$ -HSL sur *virB* et *fliF*.

Afin de confirmer cette hypothèse, des allèles de VjbR, codant pour des polypeptides mutés dans le domaine de liaison aux AHLs, ont été construits puis exprimés dans une souche délétante pour le régulateur. Nous avons montré que ces souches ne répondent plus à la présence de  $C_{12}$ -HSLs. Nous en avons déduit que VjbR est capable de lier ces molécules signal grâce a son domaine N-terminal et notamment grâce à l'aspartate 82, un résidu très conservé chez les régulateurs de type LuxR. D'autre part la surexpression du domaine de liaison aux AHLs de VjbR dans la souche *B*. *melitensis* sauvage réduit de moitié l'effet répresseur de ces molécules sur la transcription de l'opéron *virB*. Ceci confirme l'implication du domaine de liaison aux AHLs de VjbR dans la médiation de l'effet répresseur des  $C_{12}$ -HSLs sur cet opéron.

L'effet des C<sub>12</sub>-HSL sur l'état conformationnel de VjbR reste cependant indéterminé. Différentes études menées sur les régulateurs de type LuxR ont permis de mettre en évidence plusieurs cas de figure. Si dans tous les cas décrits à notre connaissance la liaison des AHLs aux régulateurs LuxR modifie leur état de multimérisation, leurs effets dépendent du régulateur. Certains, comme LuxR, LasR ou TraR, sont des activateurs transcriptionnels dimériques lorsqu'ils sont liés à leur AHL spécifique (Urbanowski et al., 2004 ; Zhu and Winans, 2001 ; Schuster et al., 2004b). D'autres, comme EsaR ou ExpR sont des répresseurs se fixant sous forme de dimère actif en absence de molécules signal (Minogue et al., 2002 ; von Bodman et al., 2003). Enfin, certains comme CarR se fixent sous forme de dimères à l'ADN cible en absence d'AHLs et bloquent la transcription des gènes en aval. La fixation de l'AHL cible conduit a la formation de tétramères alors capables d'activer la transcription des gènes cibles (Welch et al., 2000). Plusieurs cas de figure sont de ce fait envisageables dans le cas de VjbR. Nous prendrons comme exemple la régulation de l'opéron virB puisque nous avons montré grâce à la technique de ChIP que ce promoteur est régulé par fixation directe de VjbR. Nous proposons comme hypothèse de base que VjbR se fixe au promoteur de *virB* sous sa forme active en absence de molécules signal (voir Figure 38) et déclenche ainsi l'activation de la transcription de l'opéron. En présence de C<sub>12</sub>-HSL, plusieurs hypothèses sont envisageables et sont présentées dans la figure 38 :

(i) la fixation de la molécule signal entraînerait la dissociation de la forme active du régulateur, ou bien la formation d'un multimère d'ordre supérieur. Dans les deux cas ces changements conformationnels conduiraient à la dissociation du complexe VjbR-promoteur et à l'arrêt de l'activation de l'opéron *virB*.

(ii) la fixation de la molécule signal entraînerait la formation d'un multimère d'ordre supérieur qui resterait associé à l'ADN mais ne serait plus capable d'activer la transcription de l'opéron *virB*.

(iii) la fixation de la  $C_{12}$ -HSL produirait des changements conformationnels provoquant une modification de l'affinité de VjbR pour ses sites de fixation. VjbR serait alors capable de lier des sites de plus faible affinité conduisant à la répression de l'opéron *virB*. La fixation à ces sites pourrait également conduire à des modifications de la structure de l'ADN, comme la formation de boucles conduisant à l'inhibition de la transcription par exemple (Browning and Busby, 2004).



**Figure 38 :** Schéma représentant les différents effets possibles des  $C_{12}$ -HSL sur VjbR dans le cadre de la régulation de l'opéron *virB*. La première ligne représente le modèle d'activation de l'opéron *virB* par VjbR. VjbR se fixerait au promoteur de cet opéron en absence de molécule signal et en activerait alors l'expression. En présence de molécule signal, trois cas sont ici envisagés : (i) la libération de VjbR du promoteur, (ii) la formation de multimères de VjbR d'ordre supérieur conduisant à la répression de l'opéron et (iii) la fixation de VjbR à des sites de plus faible affinité conduisant à la répression de *virB*.

Lors de l'expérience de ChIP, nous avons mis en évidence deux régions de l'opéron *virB* fixées par VjbR. La première se situe dans la région amont de *virB1* et la seconde dans la région amont de *virB2*. Ce deuxième site de fixation, en accord avec la troisième hypothèse présentée cidessus, pourrait constituer un site de plus faible affinité, lié par VjbR uniquement en présence de  $C_{12}$ -HSL. Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec le résultat des ChIP puisque ces expériences ont été réalisées avec une souche exprimant le domaine de liaison à l'ADN de VjbR seulement, et nous avons montré dans ce travail qu'un tel régulateur se comporte de façon indépendante des molécules signal. Ces données pourraient donc être en accord avec la présence d'un site de fixation de VjbR dans la région intergénique *virB1-virB2* qui serait impliqué dans un mécanisme de répression dépendante des AHLs.

Plusieurs tentatives de purification de VjbR sous sa forme native ont été réalisées durant ce travail, mais se sont avérées infructueuses. Il est possible que cette difficulté soit due, comme pour d'autres régulateurs de type LuxR, à l'association de VjbR à la membrane interne (Kolibachuk and Greenberg, 1993). Cependant l'élucidation de l'effet des  $C_{12}$ -HSL sur la fixation de VjbR à ces promoteurs cibles ainsi que sur l'état d'oligomérisation du régulateur doit désormais passer par l'utilisation de techniques nécessitant la disponibilité du régulateur purifié sous sa forme native. Par exemple la réalisation d'empreintes à la DNase en présence et en absence de  $C_{12}$ -HSL permettraient de mettre en évidence de tels mécanismes.

#### IV.2 Le QS chez Brucella spp., un système complexe

Au terme de ce travail, nous pouvons dresser un bilan des connaissances actuelles sur le système de Quorum Sensing de *B. melitensis*. Ce système de régulation semble atypique par plusieurs aspects qui seront détaillés dans les paragraphes suivants.

#### IV.2.1 AHLs et AHL-synthase

*Brucella* est capable de produire deux AHLs dont l'une a clairement été identifiée comme étant une  $C_{12}$ -HSL (Taminiau *et al.*, 2002). Le système de production de ces molécules signal est inconnu à ce jour et semble inhabituel puisqu'aucun gène homologue aux gènes codant pour les enzymes des familles LuxI et LuxM/AinS n'ont été mis en évidence dans le génome de *B*. *melitensis*. D'autre part, la faible quantité d'AHLs produites par *Brucella* est également singulière puisque 18 litres de cultures ont été nécessaires à l'identification des molécules signal (Taminiau *et al.*, 2002). Cette observation peut être expliquée par différentes hypothèses :

- (i) L'absence, dans le milieu de culture utilisé lors de l'extraction des molécules signal, de stimuli qui pourraient être nécessaires à l'activation du système de synthèse des AHLs.
- (ii) La dégradation des molécules signal, dans les conditions utilisées, par une enzyme telle l'AHL-acylase de *Brucella*.
- (iii) Si *Brucella* utilise les AHLs lors de son cycle intracellulaire, il est possible qu'elle produise de plus faibles quantités d'AHLs que les bactéries extracellulaires car la niche dans laquelle elle se trouve est plus confinée. La quantité d'AHLs nécessaire à la fixation au régulateur VjbR pourrait de ce fait être plus faible.

Plusieurs tentatives d'identification de l'AHL synthase de *Brucella* ont été réalisées au laboratoire, mais se sont avérées infructueuses. L'une des difficultés rencontrées est l'absence d'activation des biosenseurs d'AHLs lorsqu'ils sont utilisés en coculture avec la souche sauvage de *B. melitensis*. Ce phénomène est probablement dû à la faible quantité d'AHLs produite par cette bactérie. L'activation de ces biosenseurs nécessite l'extraction des AHLs à partir d'au moins 500 ml de culture de *Brucella*. L'extraction des AHLs est un procédé lourd et l'utilisation de grands volumes de culture d'un pathogène de classe III rend l'utilisation de cette technique impossible dans le cadre d'un criblage de banque de mutants par exemple.

Récemment, une approche basée sur l'utilisation de la technique de double hybride a été mise en place au laboratoire. Les AHL-synthases décrites à ce jour utilisent lors de la synthèse d'AHLs soit une acyl-ACP (famille LuxI, Hanzelka *et al.*, 1996 ; Parsek *et al.*, 1999), soit l'acyl-CoA (famille LuxM/AinS, Hanzelka *et al.*, 1999) comme donneur de chaîne acyl. L'approche utilisée est basée sur l'hypothèse que l'AHL synthase de *Brucella* utiliserait une acyl-ACP comme donneur de chaîne acyl. Un crible double hybride en levure a été réalisé en utilisant les deux ACP codées par le génome de *B. melitensis* comme appâts, et une banque comprenant toutes les ORFs de *Brucella* comme proies. Une douzaine de candidats ont été mis en évidence grâce à cette technique (Thomas Rolain, Aurélie Mirabella, travail de mémoire de fin d'études). Certaines protéines candidates n'ont pas de fonctions prédites et ne sont pas conservées chez d'autres espèces bactériennes proches de *Brucella* possédant un système LuxI/LuxR, ce qui les rend particulièrement intéressantes. Les gènes codant pour ces protéines candidates pourront ensuite être surexprimés et/ou délétés dans la souche sauvage de *B. melitensis*. Le faible nombre de candidats permettrait ensuite l'utilisation de la technique d'extraction des AHLs sur les souches obtenues suivie de la détection subséquente des molécules signal par des senseurs d'AHLs.

Cette approche présente cependant de nombreux biais (hypothèse de départ, utilisation d'un modèle hétérologue pour détecter les interactions...) et la construction d'une souche biosenseur possédant une plus forte sensibilité aux AHLs constituerait probablement le moyen le plus sûr de mettre en évidence l'AHL-synthase de *Brucella* lors d'un crible génomique.

## IV.2.2 L'AHL acylase

Une gène codant pour une protéine homologue à l'AHL-acylase AiiD de *Ralstonia* (voir paragraphe I.5.3.2) a été mise en évidence dans le génome de *B. melitensis*, laissant entrevoir la possibilité d'une régulation de type Quorum Quenching chez cette bactérie. L'étude de cette AHL-acylase putative a permis de mettre en évidence que cette enzyme est capable d'inactiver des AHLs de différents types et qu'elle est sécrétée par *B. melitensis* (Julien Lemaire, thèse en cours). Le rôle de cette enzyme reste cependant à mettre en évidence. Plusieurs hypothèses sont envisageables : (i) l'AHL-acylase pourrait avoir un rôle dans la modulation du système de QS de *Brucella* comme cela a été démontré pour l'AHL-lactonase chez *A. tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002a), (ii) ce système de Quorum Quenching pourrait être impliqué dans le contrôle des systèmes de régulation QS-dépendants d'espèces bactériennes rencontrées par *Brucella* au cours de son cycle infectieux (lors d'une infection par voie orale par exemple).

#### IV.2.3 VjbR, BabR et les C12-HSL

Jusqu'alors, seuls des effets répresseurs des  $C_{12}$ -HSL, sur l'opéron *virB* et sur le gène *fliF*, avaient été décrits (Delrue *et al.*, 2005). Grâce aux expériences de qRT-PCR, nous avons montré lors de ce travail que ces molécules signal peuvent également avoir un rôle activateur sur certaines cibles (voir chapitre III.2). Dans certains cas (celui de la BMEI0433 par exemple) l'effet activateur de ces molécules signal est maintenu dans le mutant *vjbR*, mais disparaît dans le mutant *babR*. Nous suggérons donc que BabR puisse également médier l'effet des  $C_{12}$ -HSL sur certaines cibles.

Cette observation est assez inhabituelle car généralement lorsqu'une bactérie possède plusieurs régulateurs de type LuxR, ces derniers reconnaissent chacun des molécules signal qui leur sont spécifiques, c'est notamment le cas de *P. aeruginosa* (voir paragraphe I.5.1). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que BabR et VjbR puissent reconnaître chacun une AHL particulière avec une plus forte affinité. Rappelons qu'un deuxième type de molécules signal, la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL, a été mis en évidence sur base d'un profil chromatographique chez *Brucella* (Taminiau *et al.*, 2002). Il est donc possible que la  $C_{12}$ -HSL et la 3-oxo- $C_{12}$ -HSL soient reconnues préférentiellement par l'un des deux régulateurs. La construction d'allèles de *babR* codant pour des

régulateurs mutés dans le domaine de liaison aux AHLs de BabR pourrait confirmer cette hypothèse tout comme cela a été fait pour VjbR.

Les analyses transcriptomiques et protéomiques réalisées lors de ce travail nous ont permis de mettre en évidence que VjbR et BabR agissent majoritairement comme des répresseurs transcriptionnels. Cette donnée était quelque peu inattendue dans le cas de VjbR puisque les cibles de ce régulateur connues jusqu'alors étaient activées par ce dernier. Ceci démontre l'intérêt d'une approche large, à l'échelle du génome. Les régulateurs de type LuxR ont été classés en trois groupes suivant leur rôle activateur ou répresseur:

- (i) Les activateurs transcriptionnels en présence d'AHLs (Fuqua and Greenberg, 2002), c'est par exemple le cas de LuxR, TraR ou LasR.
- (ii) Les régulateurs transcriptionnels comme EsaR et ExpR agissant comme répresseur en absence de molécules signal (von Bodman *et al.*, 1998 ; Minogue *et al.*, 2002 ; von Bodman *et al.*, 2003).
- (iii) Les régulateurs comme CarR se comportant comme des répresseurs transcriptionnels en absence de molécules signal et activateurs en présence de ces mêmes molécules (Welch *et al.*, 2000).

Cependant, l'utilisation de techniques telles les DNA-microarrays ou la protéomique a permis de mettre en évidence que certains de ces régulateurs (LasR, RhlR...) sont capables d'activer certains gènes et d'en réprimer d'autres (Wagner *et al.*, 2003 ; Schuster *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2003). Ces techniques ne permettant pas de distinguer les cibles directes et indirectes des régulateurs, ces observations peuvent soit être expliquées par des régulations indirectes, soit signifier que les sites de reconnaissance de ces régulateurs sont positionnés différement sur les promoteurs cibles. Les sites activateurs sont généralement localisés en amont de la boîte -35 (Gralla, 1996, Hochschild and Dove, 1998, Browning and Busby, 2004) et les sites répresseurs à proximité des boîtes -10 et -35 ou à des sites distaux afin de permettre la formation de boucles d'ADN conduisant à la répression de la transcription (Browning and Busby, 2004).

L'effet de la position des sites de fixation des régulateurs LuxR sur la régulation de leurs cibles a été confirmé par différentes expériences réalisées *in vitro* grâce à des promoteurs artificiels. Par exemple, il a été montré que les répresseurs EsaR et ExpR (les homologues de LuxR chez *Pantoea stewartii* et *Erwinia carotovora*) lorsqu'ils se lient à des séquences cibles placées de façon appropriée sur un promoteur, sont capables d'interagir avec l'ARN-polymérase et d'en activer la transcription (von Bodman *et al.*, 2003). Des expériences similaires ont été réalisées avec LuxR et TraR et ont démontré que ces régulateurs peuvent agir comme répresseur lorsque leur site de reconnaissance est placé entre la région -1 et -35 par rapport au site d'initiation de la transcription (Luo and Farrand, 1999 ; Egland and Greenberg, 2000).

Chez *B. melitensis*, le fait que l'effet des  $C_{12}$ -HSL varie d'une cible à l'autre suggère que les sites de fixation de VjbR ou de BabR pourraient être positionnés différemment sur les promoteurs de ces gènes. Cependant, la mise en évidence du mécanisme d'action des  $C_{12}$ -HSL sur VjbR et BabR doit passer par l'utilisation de techniques biochimiques nécessitant la disponibilité de ces régulateurs purifiés sous leur forme native.

#### IV.2.4 BabR, un modérateur de l'activité de VjbR ?

Durant ce travail, nous avons mis en évidence une relation jusque-là inconnue entre les régulateurs VjbR et BabR. L'étude du protéome et du transcriptome des souches  $\Delta v j b R$  et  $\Delta b a b R$  a

permis entre autre de mettre en évidence que de très nombreuses cibles de BabR sont également communes à VjbR, puisque 27 des 42 ORFs régulées au niveau transcriptionnel par BabR le sont également par VjbR. Ce type d'observation a précédemment été effectuée avec les régulateurs LasR et RhlR de *P. aeruginosa* (pour revue voir (Soberon-Chavez *et al.*, 2005)). D'autre part les résultats de l'analyse protéomique du mutant *babR* ont mis en évidence de nombreuses protéines dont les gènes correspondant ne sont pas régulés transcriptionnellement par ce régulateur, mais par VjbR. Cette observation surprenante suggère la présence de régulations post-transcriptionelles qui pourraient entre autre être médiées par les nombreuses cibles de BabR potentiellement impliquées dans de telles régulations (*clpA*, *clpB*, *lon*, *htrA*, *dnaK*, *groES*, *groEL*).

Nous avons également montré grâce à ces analyses que VjbR a un effet positif sur l'expression de BabR et que ce dernier à un effet négatif sur celle de VjbR, formant ainsi une boucle de régulation qui tendrait à stabiliser le réseau de régulation dépendant de ces deux régulateurs. *In vitro*, les pics d'expression des promoteurs pvjbR et pbabR sont décalés. En effet le pic d'expression de vjbR est situé en début de phase exponentielle alors que celui de *babR* est situé en début de phase stationnaire. Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de boucle d'autoactivation pour BabR et VjbR.

L'ensemble de ces observations nous permettent de poser l'hypothèse que BabR serait un modérateur de l'activité de VjbR et permettrait un retour à l'état initial une fois les régulations dépendantes de VjbR accomplies. Afin de vérifier ce modèle il est nécessaire d'une part d'étudier les pics d'expression des promoteurs pvjbR et pbabR lors d'une infection cellulaire afin de savoir si pbabR est exprimé après pvjbR lors d'infections cellulaires (par une expérience de qRT-PCR par exemple) et d'autre part d'étudier l'expression de différentes cibles communes aux deux régulateurs dans la souche sauvage et dans les mutants vjbR et babR.

Au moins deux exemples connus de régulateurs pouvant agir comme modulateur de l'activité de régulateurs du QS ont été décrits. Chez *P. aeruginosa*, QscR, un régulateur de type LuxR, a pour rôle d'inhiber l'activité de LasR et RhlR dans certaines conditions (Chugani *et al.*, 2001, Ledgham *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que QscR forme des hétérodimères non fonctionnels avec les régulateurs LasR et RhlR en absence de molécules signal (Ledgham *et al.*, 2003), bloquant ainsi la régulation QS-dépendante de certains gènes dans ces conditions. Lorsque la concentration en C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (les signaux respectifs de RhlR et LasR) augmente, l'équilibre est déplacé au profit de la formation d'homodimères de LasR et/ou de RhlR, permettant alors l'activation de la cascade de régulation dépendante du QS (Lazdunski *et al.*, 2004). D'autre part, une étude transcriptomique a démontré que QscR répond à la présence de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et que son régulon comporte des gènes lui étant spécifiques ainsi que des gènes co-régulés par LasR et/ou RhlR (Lequette *et al.*, 2006).

Un système similaire a été décrit chez *A. tumefaciens*, une  $\alpha$ -protéobactérie proche de *Brucella* (voir paragraphe I.3.2.1.2). Chez cette bactérie phytopathogène, l'antiactivateur TraM séquestre le régulateur TraR en absence de molécules signal (Fuqua *et al.*, 1995).

Il serait de ce fait intéressant d'étudier la capacité de BabR et VjbR à former des hétérodimères. Ne disposant pas d'anticorps contre ces deux régulateurs, leur fusion à des tags distincts permettrait l'étude de la formation d'hétérodimères grâce à des techniques d'immunoprécipitation.

#### IV.3 VjbR, régulateur global chez B. melitensis

Nous avons montré au cours de ce travail le rôle de VjbR dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans des fonctions telles que la virulence, le métabolisme ou encore la réponse aux stress. Les structures de surface sont souvent cruciales dans les interactions hôte-pathogène. Lors de notre travail, nous avons mis en évidence l'implication de VjbR dans la régulation de diverses structures externes et de nombreux gènes codant pour des protéines localisées en membrane. D'après les expériences d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP), certains gènes codant pour ces protéines sont régulées directement par VjbR. L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un rôle crucial du régulateur VjbR dans l'adaptation de *Brucella* à son hôte. Cette hypothèse sera développée dans les paragraphes suivants.

#### IV.3.1 <u>Rôle de VjbR dans la régulation de la composition membranaire</u>

Avant de débuter ce travail, des études avaient démontré l'implication de VjbR dans la régulation de gènes codant pour deux structures de surface : l'appareil de sécrétion de type IV VirB et le système flagellaire. Dans la première partie de ce travail, l'étude du phénotype d'agrégation présenté par les souches mutées dans le gène vjbR a permis de mettre en évidence l'implication de VjbR dans la régulation de structures de surface supplémentaires. Nous avons ainsi montré que la C12-HSL a des effets sur la régulation de la production de nombreuses Omps et que ces effets sont dépendants de VjbR puisqu'ils ne sont plus observés dans le mutant vjbR. D'autre part, notre étude tanscriptomique a montré que VjbR est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes codant pour d'autres protéines membranaires impliquées notamment dans le transport de diverses molécules (acides aminés, sucres, oligopeptides, ions...). Une analyse protéomique, visant à mettre en évidence des effecteurs potentiels sécrétés par Brucella, a été réalisée sur le surnageant de culture de la souche B. melitensis sauvage (Caroline Nijskens, thèse en cours). Cette étude a permis de mettre en évidence une quarantaine de protéines, majoritairement des protéines périplasmiques, des transporteurs ainsi que quelques Omps. De façon intéressante, 54% de ces protéines correspondent à des gènes cibles de VjbR. L'ensemble de ces données montre que VjbR semble avoir un rôle majeur dans la régulation des composants membranaires chez B. melitensis.

Chez *B. abortus*, le système à deux composants BvrR/BvrS, homologue aux systèmes ChvI/ChvG d'A. *tumefaciens* et ChvI/ExoS de *S. meliloti*, est lui aussi impliqué dans le contrôle de nombreuses structures de surface. La mutation de ce système de régulation chez *B. abortus* conduit à une perte importante de l'invasivité et en conséquence de la virulence (Sola-Landa *et al.*, 1998). La mutation de ce système de régulation conduit notamment à une sensibilité accrue aux polypeptides cationiques (Sola-Landa *et al.*, 1998). Ces dernières années, des études ont démontré le rôle de BvrR/BvrS dans la régulation de différentes Omps (Guzman-Verri *et al.*, 2002) et du composant lipide A du LPS (Manterola *et al.*, 2005). D'autre part, une analyse récente visant à comparer les protéines contenues dans les vésicules membranaires relarguées par la souche sauvage de *B. abortus* et les mutants *bvrR* et *bvrS* a confirmé le rôle de ce régulateur dans le contrôle de la production de nombreuses protéines de membrane externe ainsi que de nombreuses protéines périplasmiques impliquées dans le transport de substrats (Lamontagne *et al.*, 2007).

Les systèmes de régulation dépendant de BvrR/BvrS et de VjbR sont donc tous deux impliqués dans le contrôle de la composition membranaire de *Brucella* et dans la virulence de cette dernière. Il est donc tentant d'imaginer un cross-talk entre ces deux systèmes de régulation. Nous avons donc comparé les cibles de VjbR mises en évidence lors de notre étude aux protéines mises en évidence lors de l'étude protéomique des fragments membranaires relargués par les mutants *bvrR* et *bvrS*. Si plusieurs cibles sont communes aux deux systèmes de régulation, les effets de ces
derniers peuvent être soit semblables soit opposés suivant les cibles, rendant difficile la mise en évidence d'un lien entre ces deux systèmes. Cependant, les expériences ayant conduit à l'identification des cibles de BvrR/BvrS et de VjbR ont été réalisées dans des conditions expérimentales très différentes. Les systèmes à deux composants étant d'autre part souvent connectés aux réseaux de régulation dépendants du QS (voir paragraphe I.5.1), il serait de ce fait intéressant de tester une potentielle connexion entre BvrR/BvrS et VjbR *via* par exemple l'effet de la mutation de l'un des deux systèmes sur l'expression de l'autre.

Ce travail a également permis de démontrer la capacité de Brucella à produire un exopolysaccharide dans certains contextes génétiques. Cette observation pourrait permettre de faire un lien supplémentaire entre le système de QS de Brucella el le système BvrR/BvrS, puisque le système homologue ChvI/ExoS de S. meliloti est impliqué dans la régulation de la production de succinoglycan chez cette bactérie. Il serait donc intéressant de rechercher un lien entre BvrR/BvrS et la production d'exopolysaccharide chez Brucella. Les exopolysaccharides sont les constituants majeurs de la matrice des biofilms (voir paragraphe I.2.1), la présence de tels polymères dans les agrégats formés par les souches mutées dans le gène vjbR suggère donc pour la première fois que Brucella pourrait être capable de former des biofilms. Comme cela a été discuté dans la publication résultant de cette partie du travail, la production d'exopolysaccharides par Brucella pourrait avoir différents rôles, soit au sein de l'hôte (adhésion aux muqueuses ou aux cellules cibles, protection contre les défenses de l'hôte...) soit en dehors de l'hôte (protection contre la dessiccation...). D'autre part, plusieurs maladies chroniques sont liées à la formation de biofilms (Costerton et al., 1999 ; Donlan and Costerton, 2002). La chronicité de la brucellose, encore mal comprise, pourrait être en partie expliquée par la formation de telles structures de protection par Brucella. Il serait donc intéressant de mettre en évidence la présence de biofilms formés par Brucella in vivo lors d'une infection (par exemple grâce au marquage de coupes d'organes infectés avec des anticorps dirigés contre l'exopolysaccharide produit par B. melitensis). L'étude de la structure et du rôle du ou des exopolysaccharides produits par Brucella est actuellement en cours au laboratoire (Marie Godefroid, thèse en cours). Des résultats préliminaires ont montré que les souches capables de former des agrégats semblent mieux adhérer aux cellules hôtes, suggérant que le ou les exopolysaccharides produits par B. melitensis joueraient un rôle dans l'adhérance aux cellules hôtes (Marie Godefroid, thèse en cours). De telles observations ont été faites chez Agrobacterium tumefaciens (Matthysse et al., 1981), Rhizobium meliloti (Cangelosi et al., 1987) et Neisseria gonorrhoeae (Greiner et al., 2005). L'analyse des stimuli conduisant à la production d'exopolysaccharides dans la souche B. melitensis sauvage permettrait également d'aborder leur(s) rôle(s).

## IV.3.2 Rôle de VjbR dans la virulence de B. melitensis

Parmi les cibles membranaires régulées par VjbR citées dans le paragraphe précédent, plusieurs sont impliquées dans la virulence de *Brucella* appuyant le rôle fondamental des structures de surface dans la virulence de cette bactérie. C'est le cas de l'opéron *virB* (O'Callaghan *et al.*, 1999), du système flagellaire (Fretin *et al.*, 2005) et des Omp10, Omp19 et Omp25 (Edmonds *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002a; Edmonds *et al.*, 2002b; Tibor *et al.*, 2002). D'autre part les analyses trancriptomiques et protéomiques menées sur le mutant *vjbR* ont révélé une vingtaine d'autres cibles impliquées dans la virulence de *Brucella*. Parmi ces cibles, de nombreux gènes codent pour des protéines impliquées dans le transport de métabolites et dans le métabolisme des sucres et des acides aminés.

Lors de l'infection cellulaire, *Brucella* transite par plusieurs compartiments et se retrouve donc probablement dans des environnements métaboliques très variés. Plusieurs cribles génomiques visant à mettre en évidence des gènes impliqués dans la virulence de *Brucella* ont d'ailleurs mis en évidence de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport de métabolites (Delrue *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que *Brucella* adapte son métabolisme au cours de son trafic intracellulaire. Nous proposons que le système de QS de *Brucella* pourrait faire partie des systèmes de régulation impliqués dans une telle adaptation. Lors de l'utilisation de galeries métaboliques, nous avons montré que le mutant vjbR gagne la capacité de croître sur certains substrats et perd celle de croître sur d'autres substrats. Cette observation soutient l'hypothèse de l'implication de VjbR dans la régulation du métabolisme de *B. melitensis*.

Nous avons montré que VjbR active certains gènes impliqués dans la virulence de *Brucella* et en réprime d'autres. La mutation de la plupart de ces gènes conduit à une atténuation de la virulence en modèle cellulaire, suggérant qu'ils doivent être exprimés dans ces conditions. Nous proposons qu'au cours de l'infection cellulaire, VjbR permettrait l'activation de facteurs de virulence nécessaires à la poursuite du cycle infectieux et la répression de ceux qui ne sont plus nécessaires pour la poursuite de ce cycle. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'expression de vjbR et de certaines de ses cibles impliquées dans la virulence au cours d'une infection cellulaire.

Le gène *hfq* est également une cible intéressante de VjbR. Il code pour une protéine impliquée dans les régulations post-traductionnelles dépendantes des petits ARN non codants (sRNA, voir paragraphe I.5.2.1) et dans la virulence de plusieurs espèces bactériennes dont *B. abortus* (Robertson and Roop, 1999). Les sRNA sont souvent impliqués dans la régulation des systèmes de QS (voir paragraphe I.5.2.2) ainsi que dans le contrôle de l'expression de gènes codant pour des protéines de membrane externe (Vogel and Papenfort, 2006). Aucun sRNA n'a cependant été mis en évidence chez *Brucella* à l'heure actuelle. Il serait donc intéressant de mettre en évidence leur présence chez cette bactérie et d'étudier leur interaction potentielle avec le système de QS. La mise en évidence de sRNA chez *Brucella* pourrait passer par l'immunoprécipitation des sRNA associés à Hfq à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine. Les sRNA pourraient alors être purifiés, rétrotranscrits puis clonés dans un vecteur permettant leur séquençage. De même la mise en évidence de séquences Bru-RS1 à proximité de gènes régulés par VjbR est intrigante et soulève des questions quant au rôle de ces séquences et leur lien avec le système de QS.

## IV.4 Discussion sur le rôle du QS durant l'infection

Au terme de ce travail, nous proposons un modèle dans lequel le système de QS de *Brucella* jouerait un rôle crucial lors de l'infection des cellules hôtes. La virulence du mutant *vjbR* ainsi que celles des souches mutantes dans plusieurs gènes cibles de ce régulateur est atténuée en modèle cellulaire. Nous suggérons donc que cette bactérie pathogène intracellulaire utilise le système de QS afin de contrôler certaines étapes de son cycle infectieux.

Nous avons montré que VjbR est impliqué dans la répression de plusieurs gènes codant pour des protéines telles que (i) de nombreuses protéines ribosomales, (ii) des cytochromes impliqués dans la respiration aérobie (cytochromes *bc1* et *caa3*) (iii) des transporteurs membranaires et (iv) plusieurs enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs.

Nous ne connaissons pas les signaux d'induction de VjbR lors de l'infection. Cependant, ce régulateur est nécessaire à l'activation de l'opéron *virB* qui atteint son pic d'expression 5h post-infection (Sieira *et al.*, 2004). Outre l'implication de VjbR dans l'activation de ce facteur de

virulence, nous suggérons que l'effet de VjbR sur ses cibles pourrait conduire au déclenchement d'un état de quiescence de *Brucella* au sein de la cellule hôte. En effet, les *Brucellae* ne se multiplient qu'une fois leur niche de réplication atteinte (environ 12h post-infection). Un état de quiescence transitoire pourrait donc permettre à *Brucella* de mettre en place les systèmes nécessaires à son adaptation aux différents stress rencontrés dans la cellule ainsi qu'à la disponibilité en métabolites. De part l'implication de VjbR dans l'activation de gènes codant pour (i) le cytochrome *bd* jouant un rôle dans l'adaptation à la microaérobiose dans les macrophages, (ii) des protéines chaperonnes, (iii) des transporteurs membranaires, nous proposons que ce régulateur serait impliqué dans l'adaptation de *Brucella* à de telles conditions environnementales.

Ce modèle suggère que *Brucella* utiliserait ce système de communication au sein d'un espace confiné : les BCVs (*Brucella* containing vacuoles). Les molécules signal produites par *Brucella* auraient une diffusion limitée au sein de ces vacuoles, faisant de ce système de régulation un exemple d'« Efficiency Sensing » (voir paragraphe I.3.3.3). Dans ce cas, les molécules signal s'accumuleraient non pas de part une augmentation de la population bactérienne, mais par une diffusion limitée des molécules signal dans les BCVs.

La validation d'un tel modèle doit passer par l'étude *ex vivo* de ce système de régulation, notamment par l'étude du profil d'expression de vjbR et de ces gènes cibles au cours d'infections cellulaire et par la mise en évidence de la production d'AHLs au cours de l'infection.

## Bibliographie

## **V** Bibliographie

- Ackermann, M.R., Cheville, N.F., and Deyoe, B.L. (1988) Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol* **25**: 28-35.
- Adar, Y.Y., Simaan, M., and Ulitzur, S. (1992) Formation of the LuxR protein in the *Vibrio fischeri lux* system is controlled by HtpR through the GroESL proteins. *J Bacteriol* **174**: 7138-7143.
- Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M., and Venturi, V. (2003) Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. J Bacteriol 185: 6456-6462.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6059-6063.
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., and Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90: 43-53.
- Amy, P.S.a.H.D.L. (1997) The microbiology of the terrestrial deep subsurface: CRC Lewis Publisher, Boca Raton, Fl.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I., and Gorvel, J.P. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6: 618-625.
- 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.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156-163.
- Bainton, N.J., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P.J., Rees, C.E., Winson, M.K., Salmond, G.P., Stewart, G.S., and et al. (1992) A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia. Gene* 116: 87-91.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D.S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyon, I., and Moreno, E. (2007) *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE* 2: e631.
- 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) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **12**: 403-412.
- Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**: 582-587.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell 109: 421-424.
- Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., Tam, L., Trevors, J.T., and O'Gara, F. (2005) Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas* aeruginosa through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151: 2529-2542.
- Bejerano-Sagie, M., and Xavier, K.B. (2007) The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **10**: 189-198.
- Berleman, J.E., Chumley, T., Cheung, P., and Kirby, J.R. (2006) Rippling is a predatory behavior in *Myxococcus xanthus. J Bacteriol* **188**: 5888-5895.

- Bohin, J.P. (2000) Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 11-19.
- Boschiroli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**: 58-64.
- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., and O'Callaghan, D. (2002) The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* USA 99: 1544-1549.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20-26.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S., and Ugalde, R.A. (2001) Brucella abortus cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. Infect Immun 69: 4528-4535.
- Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.
- Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.H., Wyns, L., and Loris, R. (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* **30**: 672-679.
- Callahan, S.M., and Dunlap, P.V. (2000) LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-*lux* genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 182: 2811-2822.
- Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leigh, J.A., and Nester, E.W. (1987) Common loci for Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium meliloti exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. J Bacteriol 169: 2086-2091.
- Capasso, L. (2002) Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* **45**: 122-127.
- 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.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**: 545-556.
- Celli, J., and Gorvel, J.P. (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**: 93-97.
- Celli, J. (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**: 93-98.
- 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.
- Chen, H., Teplitski, M., Robinson, J.B., Rolfe, B.G., and Bauer, W.D. (2003) Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J Bacteriol* **185**: 5029-5036.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549.

- Choi, S.H., and Greenberg, E.P. (1991) The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11115-11119.
- Choi, S.H., and Greenberg, E.P. (1992) Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* **174**: 4064-4069.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Sogaard-Andersen, L., and Kallipolitis, B.H. (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol* **186**: 3355-3362.
- Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P. (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas* aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2752-2757.
- Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., and Greenberg, E.P. (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3587-3590.
- Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., and Sperandio, V. (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10420-10425.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **3**: 159-168.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3: 213-221.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick. Sci Am 238: 86-95.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Crespi, B.J. (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* **16**: 178-183.
- Cullinane, M., Baysse, C., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **151**: 3071-3080.
- Da Re, S., Bertagnoli, S., Fourment, J., Reyrat, J.M., and Kahn, D. (1994) Intramolecular signal transduction within the FixJ transcriptional activator: *in vitro* evidence for the inhibitory effect of the phosphorylatable regulatory domain. *Nucleic Acids Res* **22**: 1555-1561.
- Davey, M.E., and O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-867.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., and Geesey, G.G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1181-1186.
- 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.
- DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2001) DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. J Bacteriol **183**: 5239-5247.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrate, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., and Letesson, J.J. (2001) Identification of *Brucella spp.* genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3: 487-497.

- Delrue, R.M., Lestrate, P., Tibor, A., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 1-12.
- Delrue, R.M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2005) A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis. Cell Microbiol* 7: 1151-1161.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 443-448.
- Deschamps, C. (2005) Caractérisation du système de Quorum Sensing de *Brucella melitensis* 16M. *Thèse.*
- Derzelle, S., Duchaud, E., Kunst, F., Danchin, A., and Bertin, P. (2002) Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens. Appl Environ Microbiol* **68**: 3780-3789.
- Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., and Cheville, N.F. (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun* **58**: 2320-2328.
- Devine, J.H., Shadel, G.S., and Baldwin, T.O. (1989) Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5688-5692.
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1339-1344.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55: 998-1014.
- Diggle, S.P., Cornelis, P., Williams, P., and Camara, M. (2006a) 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* 296: 83-91.
- Diggle, S.P., Lumjiaktase, P., Dipilato, F., Winzer, K., Kunakorn, M., Barrett, D.A., Chhabra, S.R., Camara, M., and Williams, P. (2006b) Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol* 13: 701-710.
- DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R., and Prince, A. (1995) Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* **96**: 2204-2210.
- Ding, Y., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2004) Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol* **53**: 345-354.
- Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1992) Evidence that GroEL, not sigma 32, is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol **174**: 5132-5135.

- 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.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., and Zhang, L.H. (2002) Identification of quorumquenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 68: 1754-1759.
- Dong, Y.H., and Zhang, L.H. (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43 Spec No**: 101-109.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr., and Progulske-Fox, A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 4: 1-10.
- Dozot, M., Boigegrain, R.A., Delrue, R.M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.J., De Bolle, X., and Kohler, S. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. Cell Microbiol 8: 1791-1802.
- Dunny, G.M., and Leonard, B.A. (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**: 527-564.
- Dworkin, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **60**: 70-102.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20: 2444-2449.
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., and Givskov, M. (1996) Involvement of N-acyl-L-hormoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 20: 127-136.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., Booth, N.J., Fulton, W.T., Hagius, S.D., Walker, J.V., and Elzer, P.H. (2001) Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62: 1461-1466.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., and Elzer, P.H. (2002a) *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* **88**: 205-221.
- Edmonds, M.D., Cloeckaert, A., Hagius, S.D., Samartino, L.E., Fulton, W.T., Walker, J.V., Enright, F.M., Booth, N.J., and Elzer, P.H. (2002b) Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Delta*omp25* deletion mutant. *Res Vet Sci* **72**: 235-239.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxl* promoter. *Mol Microbiol* **31**: 1197-1204.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (2000) Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J Bacteriol* **182**: 805-811.
- Egland, K.A., and Greenberg, E.P. (2001) Quorum sensing in Vibrio fischeri: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. *J Bacteriol* **183**: 382-386.

- Ekaza, E., Guilloteau, L., Teyssier, J., Liautard, J.P., and Kohler, S. (2000) Functional analysis of the ClpATPase ClpA of *Brucella suis*, and persistence of a knockout mutant in BALB/c mice. *Microbiology* **146** (**Pt 7**): 1605-1616.
- Ekaza, E., Teyssier, J., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Kohler, S. (2001) Characterization of *Brucella suis clpB* and *clpAB* mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol* **183**: 2677-2681.
- Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M., and Roop, R.M., 2nd (1994) Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperaturerequirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* 62: 4135-4139.
- Endley, S., McMurray, D., and Ficht, T.A. (2001) Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. J Bacteriol 183: 2454-2462.
- Engebrecht, J., and Silverman, M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4154-4158.
- Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S., and Hazan, R. (2004) Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol* **12**: 66-71.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., and Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**: e135.
- Enright, F.M. (1990) The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. Antigens of *Brucella*. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K., and Paulsen, I. (2002) Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet Microbiol* **90**: 249-261.
- Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., and Miller, W.G. (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). *J Vet Diagn Invest* **6**: 448-452.
- Federle, M.J., and Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**: 1291-1299.
- Ficht, T.A. (2003) Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol* **92**: 213-223.
- Finney, A.H., Blick, R.J., Murakami, K., Ishihama, A., and Stevens, A.M. (2002) Role of the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in LuxR-dependent transcriptional activation of the *lux* operon during quorum sensing. *J Bacteriol* **184**: 4520-4528.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997a) Identification of 3hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum. Mol Microbiol* **26**: 251-259.
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997b) Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. J Bacteriol 179: 7089-7097.
- Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.T., Gross, A., Carnaud, C., Kohler, S., and Liautard, J.P. (2005) Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun* 73: 6229-6236.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S., and O'Callaghan, D. (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* 68: 1297-1303.

- Freeman, J.A., and Bassler, B.L. (1999) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **181**: 899-906.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrate, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhaute, J., Tibor, A., DeBolle, X., and Letesson, J.J. (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 7: 687-698.
- Fuqua, C., Burbea, M., and Winans, S.C. (1995) Activity of the Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the traM gene. J Bacteriol 177: 1367-1373.
- 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., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005a) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34-40.
- Fux, C.A., Shirtliff, M., Stoodley, P., and Costerton, J.W. (2005b) Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol* 13: 58-63.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B., and Bauer, W.D. (2003) Production of substances by Medicago truncatula that affect bacterial quorum sensing. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 827-834.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* 178: 6618-6622.
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., and Letesson, J.J. (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36: 313-326.
- Gonzalez, J.E., and Marketon, M.M. (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing *rhizobia*. Microbiol *Mol Biol Rev* 67: 574-592.
- Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., and Losick, R. (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**: 510-513.
- Gorvel, J.P., and Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**: 281-297.
- Gottesman, S. (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**: 399-404.
- Gralla, J.D. (1996) Activation and repression of *E. coli* promoters. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 526-530.
- Greaves, D.R., and Gordon, S. (2005) Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 46: 11-20.
- Greenberg, E.P. (1997) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. ASM News 63: 371-377.
- Greiner, L.L., Edwards, J.L., Shao, J., Rabinak, C., Entz, D., and Apicella, M.A. (2005) Biofilm Formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **73**: 1964-1970.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Dornand, J. (2000) *In vitro Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68: 342-351.

- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyon, I., Moreno, E., and Lopez-Goni, I. (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12375-12380.
- Hallez R, L.J., Vandenhaute J, De Bolle X. (2006) Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in *Brucella abortus*. *Appl Environ Microbiol*.
- Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P., and Olsen, S.C. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 187: 2715-2726.
- Hammer, B.K., and Bassler, B.L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**: 101-104.
- Hammer, B.K., and Bassler, B.L. (2007) Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hanzelka, B.L., and Greenberg, E.P. (1995) Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J Bacteriol* **177**: 815-817.
- Hanzelka, B.L., and Greenberg, E.P. (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that Sadenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J Bacteriol* **178**: 5291-5294.
- Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Jr., and Greenberg, E.P. (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. J Bacteriol 181: 5766-5770.
- Hao, G., and Burr, T.J. (2006) Regulation of long-chain N-acyl-homoserine lactones in Agrobacterium vitis. J Bacteriol 188: 2173-2183.
- Hastings, J.W., and Nealson, K.H. (1977) Bacterial bioluminescence. Annu Rev Microbiol 31: 549-595.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J.U. (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5**: 230-239.
- Heurlier, K., Denervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C., and Haas, D. (2003) Negative control of quorum sensing by RpoN (sigma54) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**: 2227-2235.
- Hochschild, A., and Dove, S.L. (1998) Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell* **92**: 597-600.
- Holden, M.T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N.J., Hill, P.J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G.P., Stewart, G.S., Bycroft, B.W., Kjelleberg, S., and Williams, P. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 33: 1254-1266.
- Hong, P.C., Tsolis, R.M., and Ficht, T.A. (2000) Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* **68**: 4102-4107.
- Horinouchi, S. (2002) A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci* **7**: d2045-2057.
- Horng, Y.T., Deng, S.C., Daykin, M., Soo, P.C., Wei, J.R., Luh, K.T., Ho, S.W., Swift, S., Lai, H.C., and Williams, P. (2002) The LuxR family protein SpnR functions as a negative

regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* **45**: 1655-1671.

- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., and Leadbetter, J.R. (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5941-5949.
- Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M., and Leadbetter, J.R. (2006) Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 72: 1190-1197.
- Jiang, X., Leonard, B., Benson, R., and Baldwin, C.L. (1993) Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* **151**: 309-319.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A.S., von Gotz, F., Steinmetz, I., Eberl, L., and Tummler, B. (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**: 831-841.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Salunkhe, P., Lauber, J., Buer, J., and Tummler, B. (2005) GeneChip expression analysis of the VqsR regulon of *Pseudomonas aeruginosa* TB. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 287-295.
- Kaiser, D. (2004) Signaling in myxobacteria. Annu Rev Microbiol 58: 75-98.
- 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.
- Kay, E., Reimmann, C. and Haas D. (2006) Small RNAs in Bacterial Cell-Cell Communication. *Microbes Infect* 1: 63-69.
- Kim, J.A., Sha, Z., and Mayfield, J.E. (2000) Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect Immun* **68**: 3861-3866.
- Kim, K.S., and Farrand, S.K. (1996) Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. *J Bacteriol* **178**: 3275-3284.
- Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S., and Shirahata, T. (2003) Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun* 71: 3020-3027.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., and Shirahata, T. (2004) Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* 37: 11-19.
- Kiratisin, P., Tucker, K.D., and Passador, L. (2002) LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol* **184**: 4912-4919.
- Kohler, S., Ekaza, E., Paquet, J.Y., Walravens, K., Teyssier, J., Godfroid, J., and Liautard, J.P. (2002a) Induction of *dnaK* through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*. *Infect Immun* **70**: 1631-1634.
- Kohler, S., Porte, F., Jubier-Maurin, V., Ouahrani-Bettache, S., Teyssier, J., and Liautard, J.P. (2002b) The intramacrophagic environment of Brucella suis and bacterial response. *Vet Microbiol* **90**: 299-309.
- Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2003) What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella? Trends Microbiol* **11**: 215-219.
- Kolibachuk, D., and Greenberg, E.P. (1993) The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. *J Bacteriol* **175**: 7307-7312.

- Kolodkin-Gal, I., and Engelberg-Kulka, H. (2006) Induction of *Escherichia coli* chromosomal *mazEF* by stressful conditions causes an irreversible loss of viability. *J Bacteriol* **188**: 3420-3423.
- Lamb, J.R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V.E., and Iglewski, B.H. (2003) Functional domains of the RhlR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 185: 7129-7139.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyon, I., Moreno, E., and Paramithiotis, E. (2007) Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 6: 1519-1529.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**: 60-66.
- Lasa, I. (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* **9**: 21-28.
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A., and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas* aeruginosa PAO1. Mol Microbiol 17: 333-343.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorumsensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21: 1137-1146.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F., and Williams, P. (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, *via* HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146 (Pt 10): 2469-2480.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., and Caldwell, D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* **173**: 6558-6567.
- Lazdunski, A.M., Ventre, I., and Sturgis, J.N. (2004) Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**: 581-592.
- Leadbetter, J.R., and Greenberg, E.P. (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorumsensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**: 6921-6926.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.N., and Lazdunski, A. (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* **48**: 199-210.
- Lee, J.H., Lequette, Y., and Greenberg, E.P. (2006) Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol* **59**: 602-609.
- Lee, S.J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.Y., Koo, B.T., and Lee, J.K. (2002) Genes encoding the Nacyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3919-3924.
- Lepine, F., Milot, S., Deziel, E., He, J., and Rahme, L.G. (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa. J Am Soc Mass Spectrom* 15: 862-869.
- 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.

- Lerat, E., and Moran, N.A. (2004) The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Mol Biol Evol* **21**: 903-913.
- Lestrate, P., Delrue, R.M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C.M., and Letesson, J.J. (2000) Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* **38**: 543-551.
- Lestrate, P., Dricot, A., Delrue, R.M., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J.J., and Tibor, A. (2003) Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* **71**: 7053-7060.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P., and Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* **181**: 748-756.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., and Zhang, L.H. (2003) Acylhomoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**: 849-860.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P., and Downie, J.A. (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol Microbiol 37: 81-97.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P., and Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli. *J Biol Chem* 272: 17502-17510.
- Luo, Z.Q., and Farrand, S.K. (1999) Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9009-9014.
- Luo, Z.Q., Qin, Y., and Farrand, S.K. (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem* **275**: 7713-7722.
- Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E.P., and Ruby, E.G. (2003) The *Vibrio fischeri* quorumsensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol Microbiol* 50: 319-331.
- Lyon, G.J., and Novick, R.P. (2004) Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Grampositive bacteria. *Peptides* **25**: 1389-1403.
- Lyon, W.R., Madden, J.C., Levin, J.C., Stein, J.L., and Caparon, M.G. (2001) Mutation of *luxS* affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 145-157.
- Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nystrom, T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., and Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145 (Pt 2): 283-291.
- Manefield, M., and Turner, S.L. (2002) Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* **148**: 3762-3764.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H., Howe, J., Brandenburg, K., and Lopez-Goni, I. (2005) The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* 187: 5631-5639.

- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., and Bauer, W.D. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1444-1449.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V., and Gurlitz, R.H. (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol* **145**: 583-595.
- McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S., and Lamont, R.J. (2003) LuxSbased signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **185**: 274-284.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., and Williams, P. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143 (Pt 12): 3703-3711.
- Medina, G., Juarez, K., Valderrama, B., and Soberon-Chavez, G. (2003) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. *J Bacteriol* **185**: 5976-5983.
- 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.
- Minogue, T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F., and von Bodman, S.B. (2002) The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii ssp. stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol* **44**: 1625-1635.
- Mok, K.C., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2003) *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *Embo J* 22: 870-881.
- Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 255-261.
- More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272: 1655-1658.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., and Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**: 3569-3576.
- Moreno, E., and Moriyon, I. (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1-3.
- Moreno, E., Moriyon, I. (2001) The genus Brucella. In The prokaryotes. Electronic version. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (Eds.) (ed): Springer, New York.
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G., and Reverchon, S. (1998) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* **29**: 1391-1405.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2006) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387** (2):381-90.
- Nielsen, P. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat. Sci. Tech* **36**: 11-19.

- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* **12**: 3967-3975.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. (1999) A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. Mol Microbiol 33: 1210-1220.
- Ogawa, M., and Sasakawa, C. (2006) Bacterial evasion of the autophagic defense system. *Curr Opin Microbiol* 9: 62-68.
- Ogura, T., and Hiraga, S. (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 4784-4788.
- Ozer, E.A., Pezzulo, A., Shih, D.M., Chun, C., Furlong, C., Lusis, A.J., Greenberg, E.P., and Zabner, J. (2005) Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 29-37.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., and Tsianos, E. (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* **352**: 2325-2336.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., and Akritidis, N. (2006a) *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* 63: 2229-2236.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., and Tsianos, E.V. (2006b) The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**: 91-99.
- Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Yum, D.Y., and Lee, J.K. (2003) AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149: 1541-1550.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr., and Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4360-4365.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27-33.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., and Iglewski, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127-1130.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., and Fraser, C.M. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13148-13153.
- 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., Passador, L., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1490-1494.
- 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.

- Pedroso, M.Z., Freymuller, E., Trabulsi, L.R., and Gomes, T.A. (1993) Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. *Infect Immun* 61: 1152-1156.
- 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.
- Pestova, E.V., Havarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* 21: 853-862.
- Phillips, R.W., Elzer, P.H., and Roop, R.M., II (1995) A *Brucella melitensis* high temperature requirement A (*htrA*) deletion mutant demonstrates a stress response defective phenotype in vitro and transient attenuation in the BALB/c mouse model. *Microb Pathog* 19: 227-284.
- Phillips, R.W., Elzer, P.H., Robertson, G.T., Hagius, S.D., Walker, J.V., Fatemi, M.B., Enright, F.M., and Roop, R.M., 2nd (1997) A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. *Res Vet Sci* 63: 165-167.
- Phillips, R.W., and Roop, R.M., 2nd (2001) Brucella abortus HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice. Infect Immun 69: 5911-5913.
- Piper, K.R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (1993) Conjugation factor of Agrobacterium tumefaciens regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* 12: 2467-2476.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (1998a) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66: 5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L., and Gorvel, J.P. (1998b) Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* **66**: 2387-2392.
- Porte, F., Liautard, J.P., and Kohler, S. (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**: 4041-4047.
- 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.
- Qin, Y., Luo, Z.Q., Smyth, A.J., Gao, P., Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (2000) Quorumsensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J* 19: 5212-5221.
- Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R.C., and Wyckoff, J.H., 3rd (1996) Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus. Infect Immun* 64: 5274-5283.
- Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., and Givskov, M. (2005) Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 187: 1799-1814.

- Reading, N.C., Torres, A.G., Kendall, M.M., Hughes, D.T., Yamamoto, K., and Sperandio, V. (2007) A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. J *Bacteriol* 189: 2468-2476.
- Redfield, R.J. (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* **10**: 365-370.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., and Haas, D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 24: 309-319.
- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Defago, G., and Haas, D. (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 148: 923-932.
- Rhodius, V.A., and Busby, S.J. (1998) Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol* 1: 152-159.
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and sloughing in Serratia marcescens are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* 187: 3477-3485.
- Riedel, K., Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Gorg, A., Lottspeich, F., and Eberl, L. (2003) Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis* 24: 740-750.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S., and Jedlicki, E. (2005) A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol Res* **38**: 283-297.
- Robertson, G.T., and Roop, R.M., Jr. (1999) The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* **34**: 690-700.
- Robertson, G.T., Kovach, M.E., Allen, C.A., Ficht, T.A., and Roop, R.M., 2nd (2000) The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol Microbiol* **35**: 577-588.
- Roe, A.J., Hoey, D.E., and Gally, D.L. (2003) Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Biochem Soc Trans* **31**: 98-103.
- Romby, P., Vandenesch, F., and Wagner, E.G. (2006) The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr Opin Microbiol* **9**: 229-236.
- Roop, R.M., 2nd, Gee, J.M., Robertson, G.T., Richardson, J.M., Ng, W.L., and Winkler, M.E. (2003) *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol* 57: 57-76.
- Roop, R.M., 2nd, Bellaire, B.H., Valderas, M.W., and Cardelli, J.A. (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**: 621-630.
- Ross, H.M., Jahans, K.L., MacMillan, A.P., Reid, R.J., Thompson, P.M., and Foster, G. (1996) Brucella species infection in North Sea seal and cetacean populations. Vet Rec 138: 647-648.
- Ruby, E.G. (1996) Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 591-624.
- Saenz, H.L., Augsburger, V., Vuong, C., Jack, R.W., Gotz, F., and Otto, M. (2000) Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol* **174**: 452-455.

- 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.
- Schooling, S.R., and Beveridge, T.J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**: 5945-5957.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N., and Corbel, M.J. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* **90**: 479-496.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185: 2066-2079.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004a) The *Pseudomonas* aeruginosa RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**: 973-985.
- Schuster, M., Urbanowski, M.L., and Greenberg, E.P. (2004b) Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc* Natl Acad Sci U S A **101**: 15833-15839.
- Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P., and Williams, S.C. (2005) Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 935-947.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O., and Ugalde, R.A. (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* **182**: 4849-4855.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Pietrasanta, L.I., and Ugalde, R.A. (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon. *Mol Microbiol* **54**: 808-822.
- Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P., and Quax, W.J. (2006) Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74: 1673-1682.
- Smith, L.D., and Ficht, T.A. (1990) Pathogenesis of Brucella. Crit Rev Microbiol 17: 209-230.
- Soberon-Chavez, G., Aguirre-Ramirez, M., and Ordonez, L. (2005) Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quorum"? *Crit Rev Microbiol* **31**: 171-182.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P., and Lopez-Goni, I. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29: 125-138.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K.E., and Blasi, U. (2003) Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* **35**: 217-228.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15196-15201.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8951-8956.
- Spoering, A.L., and Gilmore, M.S. (2006) Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* **9**: 133-137.
- Stabel, T.J., Sha, Z., and Mayfield, J.E. (1994) Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase. *Vet Microbiol* **38**: 307-314.

- Stevens, A.M., Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1994) Synergistic binding of the Vibrio fischeri LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12619-12623.
- Stevens, A.M., and Greenberg, E.P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* **179**: 557-562.
- Stevens, A.M., Fujita, N., Ishihama, A., and Greenberg, E.P. (1999) Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the Vibrio fischeri luminescence genes. J Bacteriol 181: 4704-4707.
- Storz, G., Opdyke, J.A., and Zhang, A. (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**: 140-144.
- Stroeher, U.H., Paton, A.W., Ogunniyi, A.D., and Paton, J.C. (2003) Mutation of *luxS* of *Streptococcus pneumoniae* affects virulence in a mouse model. *Infect Immun* **71**: 3206-3212.
- Sturgill, G., and Rather, P.N. (2004) Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **51**: 437-446.
- Sun, J., Daniel, R., Wagner-Dobler, I., and Zeng, A.P. (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* 4: 36.
- Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.
- Taga, M.E., Semmelhack, J.L., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 42: 777-793.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M.L., Tibor, A., Lestrate, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., and Letesson, J.J. (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70: 3004-3011.
- Taminiau, B. (2003) Etude du Quorum Sensing chez Brucella melitensis 16M. Thèse.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 71: 5785-5793.
- Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M., and Halling, S.M. (1992) Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect Immun* **60**: 2863-2869.
- Teixeira-Gomes, A.P., Cloeckaert, A., and Zygmunt, M.S. (2000) Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **68**: 2954-2961.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S., Bycroft, B.W., and Pritchard, D.I. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36-42.
- Teplitski, M., Robinson, J.B., and Bauer, W.D. (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 637-648.
- Thompson, L.S., Webb, J.S., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2003) The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhlI in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 187-195.

- Tibor, A., Wansard, V., Bielartz, V., Delrue, R.M., Danese, I., Michel, P., Walravens, K., Godfroid, J., and Letesson, J.J. (2002) Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* 70: 5540-5546.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F., and Cossart, P. (2007) Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **10**: 182-188.
- Tsolis, R.M. (2002) Comparative genome analysis of the alpha-proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12503-12505.
- Ulrich, R.L. (2004) Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactonemediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6173-6180.
- Urbanowski, M.L., Lostroh, C.P., and Greenberg, E.P. (2004) Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* **186**: 631-637.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P., and Marco, S.D. (2002) The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J* 21: 4393-4401.
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C.M., and Hardie, K.R. (2005) Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 383-396.
- Venturi, V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 274-291.
- Visick, K.L., and Fuqua, C. (2005) Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. *J Bacteriol* **187**: 5507-5519.
- Vizcaino, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., and Fernandez-Lago, L. (2001) Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* **69**: 6738-6748.
- Vogel, J., and Papenfort, K. (2006) Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* **9**: 605-611.
- von Bodman, S.B., Majerczak, D.R., and Coplin, D.L. (1998) A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii. Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7687-7692.
- von Bodman, S.B., Ball, J.K., Faini, M.A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L., and Stevens, A.M. (2003) The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR(Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J Bacteriol* **185**: 7001-7007.
- von Bodman, S.B., Bauer, W.D., and Coplin, D.L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455-482.
- 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.
- Wagner, V.E., Gillis, R.J., and Iglewski, B.H. (2004) Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine 22 Suppl 1: S15-20.
- Walters, M., Sircili, M.P., and Sperandio, V. (2006) AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. J Bacteriol **188**: 5668-5681.
- Wang, L.H., He, Y., Gao, Y., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C., Wang, S.X., Weng, L.X., Xu, J.L., Tay, L., Fang, R.X., and Zhang, L.H. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51**: 903-912.

- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. (2002) Modulation of *Brucella*induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**: 341-355.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S. (2003) Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. J *Exp Med* 198: 5-17.
- 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., and Bassler, B.L. (2006) The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev* 20: 2754-2767.
- Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B., and Churchill, M.E. (2002) Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* **9**: 685-694.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J Bacteriol 185: 4585-4592.
- Welch, M., Todd, D.E., Whitehead, N.A., McGowan, S.J., Bycroft, B.W., and Salmond, G.P. (2000) N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia. Embo J* 19: 631-641.
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**: 597-607.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., and Salmond, G.P. (2001) Quorumsensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404.
- Whiteley, M., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol* **182**: 4356-4360.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.
- Williams, S.C., Patterson, E.K., Carty, N.L., Griswold, J.A., Hamood, A.N., and Rumbaugh, K.P. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. J Bacteriol 186: 2281-2287.
- Wimpenny, J., Manz, W., and Szewzyk, U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24: 661-671.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M.T., Linforth, R., Cornell, K.A., Taylor, A.J., Hill, P.J., and Williams, P. (2002) LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* 148: 909-922.
- Withers, H., Swift, S., and Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 186-193.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2005) Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* **437**: 750-753.
- Xiao, G., Deziel, E., He, J., Lepine, F., Lesic, B., Castonguay, M.H., Milot, S., Tampakaki, A.P., Stachel, S.E., and Rahme, L.G. (2006) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* 62: 1689-1699.

- Xu, F., Byun, T., Deussen, H.J., and Duke, K.R. (2003) Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol* **101**: 89-96.
- Yang, F., Wang, L.H., Wang, J., Dong, Y.H., Hu, J.Y., and Zhang, L.H. (2005) Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett* **579**: 3713-3717.
- Yu, H., and Gerstein, M. (2006) Genomic analysis of the hierarchical structure of regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14724-14731.
- Zhang, C.C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., and Bedu, S. (2006) Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* **59**: 367-375.
- Zhang, H.B., Wang, L.H., and Zhang, L.H. (2002a) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4638-4643.
- Zhang, R.G., Pappas, T., Brace, J.L., Miller, P.C., Oulmassov, T., Molyneaux, J.M., Anderson, J.C., Bashkin, J.K., Winans, S.C., and Joachimiak, A. (2002b) Structure of a bacterial quorumsensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417: 971-974.
- Zhu, J., Beaber, J.W., More, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of Agrobacterium tumefaciens. J Bacteriol 180: 5398-5405.
- Zhu, J., and Winans, S.C. (1999) Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4832-4837.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K., and Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**: 3885-3895.
- Zhu, J., and Winans, S.C. (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1507-1512.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L., and Mekalanos, J.J. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3129-3134.