

## Quorum sensing

### 1. Présentation du phénomène

De nombreuses souches bactériennes présentent des modulations de leur expression génique en fonction de leur densité de population. Ce phénomène de régulation est appelé " quorum-sensing " (QS) (détection de quorum).

Les bactéries à QS sécrètent des signaux moléculaires auto-inducteurs. À basse densité de population bactérienne, la diffusion conduit à une concentration de l'auto-inducteur dans l'environnement trop faible pour être perçu. En revanche, à la suite d'une forte multiplication cellulaire dans un espace confiné, la concentration de l'auto-inducteur va dépasser un seuil critique qui est alors perçu par les bactéries qui le produisent : le quorum est atteint. Un effet remarquable de cette perception est d'activer la production du signal auto-inducteur lui-même, conduisant ainsi à une boucle de rétroaction positive permettant de synchroniser le QS au sein de la population microbienne.

La présence des auto-inducteurs est perçue par des récepteurs protéiques intracellulaires. Ces récepteurs fixent l'auto-inducteur dont la concentration intracellulaire reflète la concentration extracellulaire. Le récepteur ainsi activé reconnaît des séquences d'ADN spécifiques des gènes et active ou réprime leur transcription.

Les fonctions régulées par QS sont très diverses chez les bactéries. Elles incluent le pouvoir pathogène, le transfert conjugatif de plasmides, la production d'antibiotiques ou d'antifongiques ... Par exemple, des bactéries d'abord opportunistes vont croître au niveau de l'organisme hôte sans effets jusqu'à ce le QS soit enclenché et devenir alors agressives ...

Les auto-inducteurs sont perçus à des concentrations très faibles. Chez les bactéries Gram négatives les auto-inducteurs du QS sont souvent des molécules de type N-acyl-homosérine-lactones (AHL) (voir document Table 1 en annexe en fin de document). Au sein des écosystèmes, il existe des communications croisées entre espèces.

#### ***Chromobacterium violaceum* CV026 as a biosensor:**

*Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacterium that produces a purple pigment, violacein, under quorum sensing control. The strain used as a biosensor, *Chromobacterium violaceum* CV026, is a mini-*Tn5* mutant strain unable to produce AHL and thus unable to produce the purple pigment. Upon the addition of external AHL (commercial, purified or supernatants that have AHLs), the mutation is complemented and violacein is produced. This is the basis of the direct assay with *Chromobacterium violaceum* CV026, which detects AHLs with acyl-side chains with 4 to 8 carbon atoms. A positive result is the production of a purple halo on a white background.

The presence of antagonistic AHLs can inhibit the complementation of the mutation. Thus, if the biosensor strain is put in the presence of the natural inducer (commercial AHL) and an antagonistic AHL is present as well, the mutation will not be complemented. This is the basis of the reverse assay with *Chromobacterium violaceum* CV026, which detects AHLs with acyl side chains longer than 8 carbon atoms. A positive result is the production of a white halo on a purple background.

(From Dr. Graciela Brelles-Mariño Biological Sciences Department, California State Polytechnic University, 2009.)

Compte-rendu : Présenter le phénomène de QS sous forme d'un schéma légendé.

## 2. Souches disponibles

Culture de la nuit du « biosensor » *Chromobacterium violaceum* CV026 en milieu LB, 28°C. (CV026 = Mutant non producteur d'AHLs mais répondant toujours aux AHLs - à chaîne courte - par la production de violacéine) (cf. ci-dessus).

Cultures à tester. Cultures de la nuit en milieu LB, 28-30°C des souches ci-dessous. *Pseudomonas aeruginosa* (a priori producteur d'AHLs à longues chaînes), *Aeromonas hydrophila* (a priori producteur d'AHLs à courtes chaînes, C4), *Yersinia enterocolitica* (a priori producteur d'AHLs à courtes chaînes mais aussi à longues chaînes), *Bacillus subtilis* et *E. coli* (témoins négatifs).

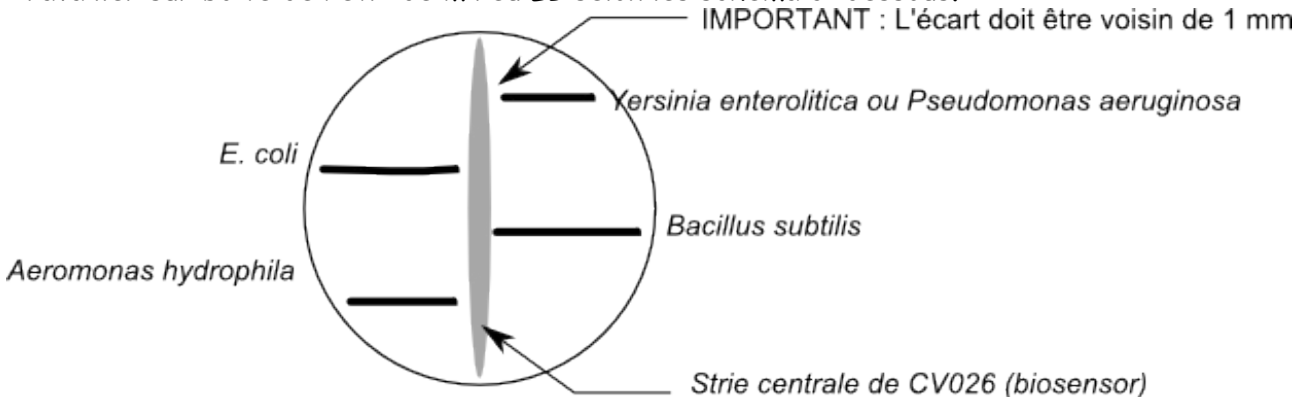
*Peptobacterium carotovorum* ATTM : producteur d'une enzyme détruisant les AHLs.

## 3. Travail pratique à réaliser

### 3.1 Détection d'AHLs à 4 à 8 carbones dans les chaînes acyles latérales

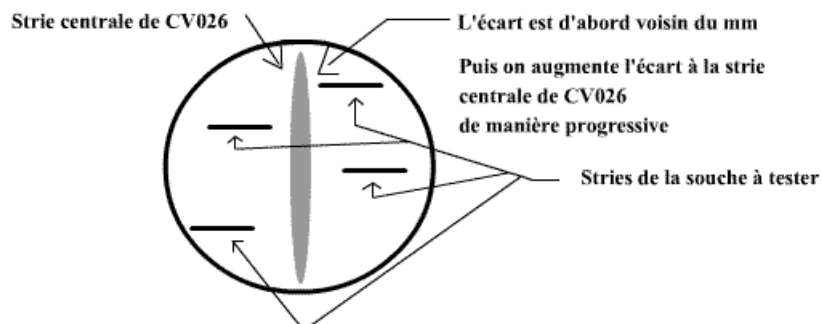
#### 3.1.1 Méthode adaptée de Agreg. bioch.- gén. biol., tp microbiologie, session 2005

Travailler sur boîte de Pétri de milieu LB selon les schéma ci-dessous.



- Superposer 2 stries réalisées avec 15  $\mu\text{L}$  de culture de CV026 tirés à l'anse plastique pour réaliser la strie centrale.
- Les stries des autres souches sont réalisées à partir de 15  $\mu\text{L}$  de culture.
- Déposer également un spot de 10  $\mu\text{L}$  de solution étalon de HHL à 5  $\mu\text{mol/L}$ .
- Culture à 28°C.

Puis réaliser, en testant *Yersinia enterocolitica* ou *Pseudomonas aeruginosa* le travail présenté par le schéma ci-dessous :



Compte-rendu : résultats obtenus et analyse des résultats.

### 3.1.2 Méthode adaptée de Microbiology. 1997 Dec;143 ( Pt 12):3703-11 et Graciela Brelles-Mariño, California State Polytechnic University

Tester des surnageants de culture selon le mode opératoire ci-dessous.

#### Supernatants preparation

- Pour a few ml of each bacterial suspension to be tested into an tube.
- Centrifuge the tubes at 4000 g (or more) for 5 minutes.
- Remove each supernatant, filter through a sterile 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter and place it into another labeled sterile eppendorf tube.

#### Direct assay

- Seed 3 mL of molten semi-solid medium (LB agar 0,3%(w/v)) at 45 °C (surfusion) with 30  $\mu\text{L}$  of an overnight LB culture of *C. violaceum* CVO26 and pour immediately over the surface of a LB agar plate.
- Divide the plate in 4. Each area will be used to test one bacterial supernatant.
- Let the plate dry.
- Gently pour 10  $\mu\text{L}$  of the supernatant to be tested. Note: Don't break the agar, just pour the drop without touching the surface (or 20  $\mu\text{L}$ , or 40  $\mu\text{L}$ , but it needs a well in the medium)
- In the center of the plate, pour a 5  $\mu\text{L}$  of the commercial AHL C6-HSL (5  $\mu\text{M}$ , N-(3-hexanoyl)-DL-homosérine lactone) as a positive control.
  - Let the plate dry.
  - Incubate the plates at 28 °C, 24 hrs.

Compte-rendu : résultats obtenus et analyse des résultats. Comparer les résultats obtenus avec ceux du § 3.1.1

### 3.2 Détection d'antagonistes ou inhibition du QS de *C. violaceum*

Tester 4 surnageants de culture (*Pseudomonas aeruginosa*, *Peptobacterium carotovorum* ATTM et 2 autres souches de votre choix) selon le mode opératoire proposé ci-dessous.

#### Preparation of the reverse assay plates:

- Label a Petri dish with LB agar. Divide the plate in 4. Each area will be used to test one bacterial supernatant.
- Place 5  $\mu\text{L}$  of each bacterial supernatant in each area of the Petri dish. (The *Pseudomonas aeruginosa* supernatant is supposed to be a positive control)
- Let the plate dry.
- While the plate is drying out, prepare the tubes as follows:
- Pour 3 mL of the semi solid molten medium. If you are not going to process the tubes immediately, place them into the water bath. Add 100  $\mu\text{L}$  of a moderately turbid bacterial suspension of CV026 in 3 mL of semi-solid molten LB medium (45°C, surfusion). Vortex the mixture. Add 2  $\mu\text{L}$  of the commercial HHL 5  $\mu\text{M}$  and vortex the mixture. Precaution: the AHL is dissolved in acetonitrile which is a very volatile solvent. Add the commercial AHL into the mixture being sure that the tip touches the mixture.
- Pour this mixture onto the surface of the agar plate prepared as indicated above.
- Let it dry.
- Incubate the plates at 28 °C, 24 hrs.

Compte-rendu : résultats obtenus et analyse des résultats.

---

**Table 1. Différentes N-acyl-homosérine-lactones (AHL) et effet sur *C. Violaceum* CV026 (Microbiology. 1997 Dec;143 ( Pt 12):3703-11))**

**Table 1.** Structures and relative activities of AHL and AHT compounds in the *C. violaceum* CV026 agar plate bioassays

R	X	Chemical name	Abbreviation	Amount applied (nmol)*	
				Activation	Inhibition
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	O	N-Butanoyl-L-homoserine lactone	BHL	0-9	NA
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	S	N-Butanoyl-L-homocysteine thiolactone	BHT	1-7	NA
CH <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxobutanoyl)-L-homoserine lactone	OBHL	3-5	NA
PhCH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-Benzoylacetyl-L-homoserine lactone	BAHL	1-53	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	O	N-Hexanoyl-L-homoserine lactone	HHL	0-03	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	S	N-Hexanoyl-L-homocysteine thiolactone	HHT	0-05	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserine lactone	OHHL	0-19	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxohexanoyl)-D-homoserine lactone	(D)OHHL	12-0	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub>	S	N-(3-Oxohexanoyl)-L-homocysteine thiolactone	OHHT	0-69	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	O	N-Octanoyl-L-homoserine lactone	OHL	0-22	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone	OOHL	0-33	NA
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	O	N-Decanoyl-L-homoserine lactone	DHL	NA	0-49
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	ODHL	NA	4-6
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	O	N-Dodecanoyl-L-homoserine lactone	dDHL	NA	4-4
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	OdDHL	NA	4-2
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	O	N-Tetradecanoyl-L-homoserine lactone	tDHL	NA	4-0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COCH <sub>2</sub>	O	N-(3-Oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone	OtDHL	NA	3-8

\*Amount of a given compound added to a well cut in the agar to either induce violacein production (activation) or inhibit HHL-mediated induction of violacein production (inhibition) in CV026. NA, No activity i.e. the compound is unable to either induce or to antagonize HHL-mediated induction of violacein in CV026.

## Bibliographie

- McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P ; Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum* : exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones ; *Microbiology*. 1997 Dec;143 ( Pt 12):3703-11
- Agrégation de biochimie - génie biologique, épreuve pratique de microbiologie, session 2005
- <http://www.csupomona.edu/~gbrelles/Mic428L/Lab%208.doc>
- Swift, Lynch, Fish, Kirke, Tomás, Stewart and Williams ; Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila* ; *Infection and Immunity*, October 1999, p. 5192-5199, Vol. 67, No. 10
- Morohoshi, Ebata, Nakazawa, Kato and Ikeda ; N-acyl Homoserine Lactone-Producing or -Degrading Bacteria Isolated from the Intestinal Microbial Flora of Ayu Fish (*Plecoglossus altivelis*) ; *Microbes and Environments* Vol. 20 (2005) , No. 4 pp.264-268
- Atkinson, Chang, Sockett, Cámara and Williams ; Quorum Sensing in *Yersinia enterocolitica* Controls Swimming and Swarming Motility ; *Journal of Bacteriology*, February 2006, p. 1451-1461, Vol. 188, No. 4
- Jangid, Kong, Patole and Shouche , *uxrI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*, *BMC Microbiol.* 2007; 7: 93  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367215/>