

Institut National de la Recherche Scientifique - Armand-Frappier Santé Biotechnologie

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES PAR LA BACTERIE *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*

Par

Sarah Martinez

Thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Dr Richard Villemur
INRS-AFSB

Examineur externe

Dr Ahmad M. Abdel-Mawgoud Saleh
Université Laval

Examineur externe

Dr Marylise Duperthuy
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr Eric Déziel
INRS-AFSB

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier le Pr Eric Déziel de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir toujours pris le temps de répondre, avec le sourire, à mes questions. Merci d'avoir respecté mes idées et d'avoir essayé de me faire voir plus loin que ce que je connaissais déjà.

Je tiens à adresser un grand merci à Marie-Christine, autant pour son support technique, moral et linguistique que pour sa gentillesse et sa patience à toute épreuve. Tu as éradiqué les « thanks to » de mon vocabulaire ! Merci à Sylvain Milot pour m'avoir entre autres initiée au LC-MS, cette machine qui malgré presque quatre ans résiste encore parfois à mes échantillons...Et merci à Arnaldo Nakamura pour avoir été aussi gentil et rapide pour préparer mes coupes de microscopie électronique.

Un grand merci à tous mes collègues, étudiants à la maîtrise ou au doctorat, qui ont contribué à l'ambiance du laboratoire et qui sont devenus pour certains des amis. Merci donc à Sophie, Fabrice et Audrey-Anne pour m'avoir accueillie dans la gang québécoise.

Merci à tous les amis d'ici ou d'ailleurs dans le monde, qui ont entendu au moins une fois parler de cette folie de reprendre les études pour faire un doctorat, qui sont venus voir mon nouvel environnement en amenant du réconfort gustatif avec eux, ou qui ont été une oreille attentive ou une épaule quand j'en ai eu besoin au cours de ces quatre ans. Delphine, Stéphanie, Marie, Ingrid : vous êtes toujours avec moi dans mon cœur malgré les kilomètres, les moments de joie ou de doute, et les années qui défilent!

Enfin, et surtout, mon plus grand merci va à Sam Looney, qui a supporté toutes mes infidélités quand je devais passer mes week-ends ou mes nuits avec cette chère *B. thailandensis*. Merci de m'avoir suivie, d'avoir tout quitté, d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue tout au long de ce projet. Tout cela n'aurait pas été possible sans ta présence au quotidien. J'espère que tu auras un bon retour sur investissement !

RÉSUMÉ

Les agents tensioactifs sont des molécules amphiphiles utilisées aussi bien en détergence ménagère qu'industrielle, en passant par le marché des industries techniques et agricoles, ou encore l'hygiène corporelle et la cosmétique (ADEME-AGRICE, 2001). Par souci écologique, les recherches se tournent de plus en plus vers les surfactants d'origines biologiques, comme par exemple les rhamnolipides. Les rhamnolipides ont été pour la première fois mis en évidence lors d'une étude sur *Pseudomonas aeruginosa*, et sont depuis largement étudiés chez ce pathogène opportuniste. En raison de leurs excellentes propriétés tensioactives, de leur faible toxicité et de leur biodégradabilité élevée, ils sont considérés comme étant parmi les biosurfactants présentant le potentiel le plus élevé pour devenir la prochaine génération de tensioactifs d'origine biologique à être introduite sur le marché. Néanmoins la production des rhamnolipides à l'échelle commerciale n'est pas encore compétitive avec celle des surfactants d'origine synthétique du fait notamment de la productivité insuffisante, des coûts élevés des matières premières et de récupération post-production. Afin de limiter les coûts de production liés au niveau de confinement, l'utilisation de bactéries non pathogènes est préférée, telle *Burkholderia thailandensis*. Cependant, les connaissances sont présentement limitées sur les facteurs génétiques et environnementaux contrôlant les rhamnolipides chez cette espèce bactérienne.

L'objectif des travaux réalisés au cours de ce doctorat est l'amélioration de la production de rhamnolipides chez la bactérie *B. thailandensis*. La thèse présentée ici porte sur les approches qui ont été employées dans le but de générer des souches présentant le meilleur rendement de production possible en rhamnolipides, à savoir l'évolution dirigée et la mutagenèse aléatoire chez *B. thailandensis*. Ces deux techniques ont permis de mettre en évidence de nouveaux régulateurs impliqués dans la production des rhamnolipides. Ces travaux ont aussi révélé que *B. thailandensis* est également capable de produire des polyhydroxyalcanoates, un autre métabolite d'intérêt biotechnologique. En effet, j'ai démontré que la mesure de densité optique n'était pas fiable du fait de la production élevée de PHA. Enfin, un travail d'optimisation de milieu de culture pour la production des rhamnolipides et des PHA a été réalisé par la mise en place d'un plan d'expérience de Taguchi.

Mots-clés : *B. thailandensis* ; rhamnolipides ; optimisation ; évolution dirigée ; mutagenèse aléatoire ; polyhydroxyalcanoates ; régulation.

ABSTRACT

Surfactants are amphiphilic compounds used in a wide diversity of applications in several fields, such as pharmaceutical and food industries. They are currently derived from non-sustainable petrochemical processes and pose a significant concern because of their poor biodegradability and notable environmental toxicity. As a consequence, increasing investigations are focused on biosurfactants, such as rhamnolipids, which represent an interesting and sustainable alternative to synthetic surfactants. Identified for the first time in *Pseudomonas aeruginosa* cultures, rhamnolipids are among the best-studied biosurfactants. Their excellent tensioactive properties, low toxicity and high biodegradability make them among the biosurfactants presenting the most promising potential for large scale biotechnological processes. Because of the pathogenicity of *P. aeruginosa*, non-pathogenic bacteria are investigated to find new species for the implementation of industrial processes for rhamnolipid production. *Burkholderia thailandensis* was previously identified as an interesting candidate. However, current processes for rhamnolipid production by this bacterium are not efficient, delivering only low yields. This is largely due to limited knowledge on biosynthesis of rhamnolipids in *B. thailandensis*. Identifying regulatory factors could help increase the production of this biosurfactant. The present work deals with different strategies that were implemented to identify *B. thailandensis* mutants with enhanced capabilities for rhamnolipid production. Random mutagenesis and directed evolution experiments were performed. These two strategies uncovered new regulators involved in rhamnolipid production. Our study also revealed that *B. thailandensis* is able to produce polyhydroxyalkanoates (PHA), which represent another interesting metabolite for biotechnological processes. Indeed, I demonstrate that *B. thailandensis* is a high PHA-producer and that the optical density measurement is not reliable with this bacterium because of the high concentrations of intracellular PHAs granules produced. Finally, an experimental plan was realized to optimize both rhamnolipid and PHAs production using Taguchi's tables.

Keywords : *B. thailandensis*; rhamnolipids; optimization; directed evolution; random mutagenesis; polyhydroxyalkanoates; regulation.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est constituée de 13 chapitres. Les deux premiers chapitres sont une revue de littérature et une explication des hypothèses et objectifs de ce doctorat.

Les deux chapitres suivants sont composés d'articles rédigés et soumis. Le premier constitue en fait une note décrivant une observation importante pour la culture de *B. thailandensis* alors que le second met en évidence un régulateur impliqué dans la production des rhamnolipides, que nous avons découverts *via* l'utilisation de la mutagenèse aléatoire par transposition.

Quatre chapitres supplémentaires portent sur des résultats non publiés ou en cours de publication. Le premier chapitre supplémentaire porte sur la découverte d'un autre régulateur impliqué dans la production des rhamnolipides par la mise en place d'une stratégie d'évolution dirigée (article en cours de soumission). Les trois chapitres suivants constituent des chapitres intégrant des données préliminaires ou demandant à être plus approfondies. Après la découverte de la capacité de *B. thailandensis* à produire des polyhydroxyalcanoates, une étude des mutants des gènes impliqués dans la synthèse ou la régulation des PHAs a été réalisée, constituant le second chapitre supplémentaire. De plus, j'ai aussi mis en évidence que la production des rhamnolipides est négativement régulée par le *quorum sensing*, donnant un troisième chapitre supplémentaire. Enfin, l'objectif initial étant l'optimisation de la production des rhamnolipides, un plan d'expérience a également été réalisé pour l'optimisation de ce métabolite par le milieu de culture, donnant lieu ainsi à un dernier chapitre supplémentaire.

Finalement, une conclusion générale de l'ensemble du projet ainsi que les perspectives sont proposées.

Trois chapitres constituent des annexes à ces travaux.

TABLE DES MATIÈRES

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES PAR LA BACTERIE <i>BURKHOLDERIA THAILANDENSIS</i>	I
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	VII
AVANT-PROPOS	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES TABLEAUX	XXI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXIII
1 INTRODUCTION	1
1.1 LES SURFACTANTS	1
1.1.1 <i>Définition et propriétés</i>	1
1.1.2 <i>Classification des surfactants d'origine chimique</i>	1
1.1.3 <i>Notion de tension de surface</i>	2
1.1.4 <i>Concentration micellaire critique</i>	2
1.1.5 <i>Les surfactants d'origine biologique</i>	3
1.2 LES RHAMNOLIPIDES.....	5
1.2.1 <i>Structure</i>	5
1.2.2 <i>Rôle chez les organismes producteurs</i>	7
1.2.3 <i>Les organismes producteurs</i>	10
1.2.4 <i>La biosynthèse des rhamnolipides</i>	14
1.2.5 <i>Les facteurs impliqués dans la production de rhamnolipides</i>	20
1.3 LA PRODUCTION DES RHAMNOLIPIDES CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	24
1.3.1 <i>Burkholderia thailandensis</i>	24
1.3.2 <i>Organisation génétique</i>	25
1.3.3 <i>Origine des précurseurs : voie métaboliques impliquées</i>	26
1.3.4 <i>La régulation de la production des rhamnolipides par le quorum sensing</i>	27
1.4 APPLICATIONS INDUSTRIELLES ET MARCHÉ DES RHAMNOLIPIDES	32
1.4.1 <i>Intérêts biotechnologiques et applications</i>	32
1.4.2 <i>Marché des rhamnolipides</i>	34
1.5 LES POLYHYDROXYALKANOATES	35

1.5.1	<i>Nature des PHAs</i>	35
1.5.2	<i>Les PHA synthases et organisation génétique</i>	37
1.5.3	<i>Mécanismes de déclenchement de la production des PHAs</i>	39
1.5.4	<i>Régulation de la biosynthèse des PHAs</i>	41
1.5.5	<i>La biosynthèse des PHAs chez B. thailandensis</i>	42
1.6	LES VOIES D'OPTIMISATION DE PRODUCTION DE METABOLITES	43
1.6.1	<i>L'amélioration du potentiel de production de la souche bactérienne</i>	43
1.6.2	<i>La définition du milieu nutritif optimal pour la production du métabolite d'intérêt</i>	44
1.6.3	<i>Stratégies de fermentation</i>	44
2	. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS:	47
3	PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1:	49
3.1	ABSTRACT.....	50
3.2	IMPORTANCE	50
3.3	INTRODUCTION	50
3.4	MATERIALS AND METHODS	52
3.4.1	<i>Strains and growth conditions</i>	52
3.4.2	<i>PHA quantification by Nile Blue staining</i>	52
3.4.3	<i>Transmission electron microscopy</i>	53
3.5	RESULTS AND DISCUSSION.....	53
3.5.1	<i>Optical density at 600 nm is not representative for growth measurement in B. thailandensis</i>	53
3.5.2	<i>PHA production is responsible for the OD difference between the wildtype strain and phaC- mutant</i>	55
3.6	CONCLUSION.....	57
3.7	FUNDING INFORMATION.....	58
3.8	ACKNOWLEDGEMENTS	58
4	. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2:	59
4.1	ABSTRACT.....	61
4.2	IMPORTANCE	61
4.3	INTRODUCTION	62
4.4	MATERIALS AND METHODS	63
4.4.1	<i>Strains and plasmids</i>	63
4.4.2	<i>Growth conditions</i>	64
4.4.3	<i>Random mutagenesis</i>	65
4.4.4	<i>Identification of transposon insertion sites by sequencing (Tn-seq)</i>	65
4.4.5	<i>Construction of plasmids</i>	65

4.4.6	<i>β-galactosidase activity assays</i>	66
4.4.7	<i>Rhamnolipid quantification by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)</i>	66
4.4.8	<i>Quantification of polyhydroxyalkanoates</i>	67
4.4.9	<i>Transmission electron microscopy (TEM) for visualisation of PHA granules</i>	67
4.5	RESULTS.....	67
4.5.1	<i>Random mutagenesis reveals a rhamnolipid overproducer of B. thailandensis E264.</i>	67
4.5.2	<i>A scmR- mutant overproduces rhamnolipids</i>	69
4.5.3	<i>Transcription of both rhl operons is augmented in a scmR- mutant</i>	71
4.5.4	<i>ScmR positively influences PHA biosynthesis</i>	72
4.6	DISCUSSION AND CONCLUSION	74
4.7	SUPPLEMENTARY DATA S1.....	77
4.8	FUNDING INFORMATIONS.....	78
4.9	ACKNOWLEDGEMENTS	78
4.10	PRESENTATION DES RESULTATS ADDITIONNELS DE L'ARTICLE	78
4.10.1	<i>Bilan des mutations impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides</i>	78
4.10.2	<i>BetB, une enzyme impliquée dans la production des rhamnolipides mis en évidence par mutagenèse aléatoire chez B. thailandensis</i>	83
4.10.3	<i>Le système de sécrétion de type VI</i>	88
4.11	CONCLUSIONS GENERALES SUR L'ARTICLE 2.....	91
5	. PRESENTATION DE L'ARTICLE 3	93
5.1	ABSTRACT.....	95
5.2	IMPORTANCE.....	95
5.3	INTRODUCTION	96
5.4	MATERIALS AND METHODS	97
5.4.1	<i>Bacterial strains and plasmids</i>	97
5.4.2	<i>Media and growth conditions</i>	99
5.4.3	<i>Directed evolution experiments</i>	99
5.4.4	<i>Rhamnolipid quantification</i>	101
5.4.5	<i>DNA extraction and whole genome sequencing:</i>	101
5.4.6	<i>Data analysis</i>	101
5.4.7	<i>Vector construction</i>	101
5.4.8	<i>β-galactosidase activity assays</i>	101
5.4.9	<i>RNA extraction</i>	102
5.4.10	<i>RT-qPCR assays</i>	102
5.5	RESULTS.....	103
5.5.1	<i>Surface tension favors rhamnolipid production of a B. thailandensis population</i>	103
5.5.2	<i>Highlighted gene mutations revealed by whole genome sequencing</i>	105

5.5.3	<i>Rhamnolipid production is under the control of the transcriptional regulator QsmR</i>	106
5.5.4	<i>QsmR act as a repressor of the rhl operons in B. thailandensis</i>	107
5.5.5	<i>QsmR negatively regulates the expression of the neighboring operon mdtABC</i>	108
5.5.6	<i>Prediction of the proteic sequences ans structures associated to the qsmR gene mutation carrying evolvents and structure analysis</i>	109
5.5.7	<i>Effect of QsmR on pH in rhamnolipid production culture medium</i>	112
5.6	DISCUSSION AND CONCLUSION	112
5.7	SUPPLEMENTARY FIGURE S1	115
5.8	FUNDING INFORMATIONS	116
5.9	ACKNOWLEDGEMENTS	116
5.10	PRESENTATION DES RESULTATS ADDITIONNELS DE L'ARTICLE	116
5.10.1	<i>Complémentation du mutant qsmR</i>	116
5.10.2	<i>Caractérisation phénotypique des évoluants sélectionnés</i>	117
5.10.3	<i>Etude des mutations trouvées dans les évoluants des lignées 1 et 3</i>	120
5.10.4	<i>Modélisation du site de reconnaissance de ligand du régulateur QsmR</i>	124
5.10.5	<i>Étude de la production de PHA chez le mutant qsmR⁻</i>	127
5.10.6	<i>Conclusions générales</i>	129
6	PRESENTATION DE L'ARTICLE 4	131
6.1	ABSTRACT	133
6.2	INTRODUCTION	133
6.3	MATERIALS AND METHODS	135
6.3.1	<i>Microorganisms and culture conditions:</i>	135
6.3.2	<i>CFU counts:</i>	136
6.3.3	<i>Quantification of rhamnolipids:</i>	136
6.3.4	<i>Quantification of PHA:</i>	136
6.3.5	<i>RNA extraction.</i>	136
6.3.6	<i>RT-PCR quantitative:</i>	137
6.4	RESULTS	137
6.4.1	<i>PHA and rhamnolipid biosynthesis are not linked</i>	137
6.4.2	<i>Identification of genes involved in PHA metabolism in B. thailandensis</i>	140
6.4.3	<i>PhaR modulates both rhamnolipid and PHA productions</i>	140
6.4.4	<i>PhaR represses the transcription of phaZ</i>	141
6.5	DISCUSSION AND CONCLUSION	143
6.6	FUNDING INFORMATIONS	147
6.7	ACKNOWLEDGEMENTS	147
6.8	PRESENTATION DES RESULTATS ADDITIONNELS DE L'ARTICLE	147

6.8.1	<i>La production de rhamnolipides est diminuée chez les mutants des gènes codant la biosynthèse des PHAs en milieu minimal.....</i>	148
6.8.2	<i>La production de rhamnolipides est augmentée chez le mutant phaR- en milieu minimal ..</i>	149
6.8.3	<i>La dépolymérisation des PHAs contribue à la production des rhamnolipides en milieu minimal ..</i>	151
6.8.4	<i>Conclusions et perspectives.</i>	152
7	PRESENTATION DE L'ARTICLE 5.....	154
7.1	ABSTRACT.....	155
7.2	INTRODUCTION	155
7.3	MATERIALS AND METHODS	157
7.3.1	<i>Bacterial strain and plasmids:.....</i>	157
7.3.2	<i>Culture conditions:</i>	157
7.3.3	<i>Rhamnolipid quantification:.....</i>	158
7.3.4	<i>PHA biosynthesis measurement by fluorescence:</i>	158
7.3.5	<i>Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) experiments:</i>	158
7.3.6	<i>Transmission electron microscopy (TEM) for visualisation of PHA granules:</i>	159
7.4	RESULTS.....	159
7.4.1	<i>QS controls the production of both rhamnolipid and PHA.</i>	159
7.4.2	<i>The QS-3 system is a repressor of rhamnolipid biosynthesis.</i>	160
7.4.3	<i>QS modulates the expression of scmR.</i>	162
7.5	DISCUSSION AND CONCLUSION	163
7.6	FUNDING INFORMATIONS.....	166
7.7	ACKNOWLEDGEMENTS	166
7.8	RESULTATS ADDITIONNELS DE L'ARTICLE	166
7.8.1	<i>Production de rhamnolipides dans les mutants cumulatifs du QS et de scmR.</i>	166
7.8.2	<i>Conclusions générales de l'article</i>	169
8	PRESENTATION DE L'ARTICLE 6.....	173
	IMPLEMENTATION OF TAGUCHI'S TABLE FOR THE OPTIMIZATION OF RHAMNOLIPID PRODUCTION IN	
	<i>BURKHOLDERIA THAILANDENSIS</i>	173
8.1	ABSTRACT.....	174
8.2	INTRODUCTION	174
8.3	MATERIALS AND METHODS	176
8.3.1	<i>Microorganism and inoculum preparation.....</i>	176
8.3.2	<i>Quantification of rhamnolipid</i>	176
8.3.3	<i>Selection of minimal medium</i>	176

8.3.4	<i>Selection of optimal carbon source</i>	176
8.3.5	<i>Ethanol toxicity evaluation</i>	177
8.3.6	<i>Ethanol consumption measurement</i>	177
8.3.7	<i>Selection of optimal temperature</i>	178
8.3.8	<i>Selection of optimal nitrogen and phosphates sources</i>	178
8.3.9	<i>Taguchi's table</i>	179
8.3.10	<i>Confirmation run</i>	181
8.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	182
8.4.1	<i>Selection of a minimal medium</i>	182
8.4.2	<i>Selection of the optimal carbon source</i>	182
8.4.3	<i>Study of the ethanol toxicity</i>	185
8.4.4	<i>Study of the ethanol consumption</i>	185
8.4.5	<i>Selection of the optimal temperature</i>	186
8.4.6	<i>Selection of optimal nitrogen source and phosphate buffer composition</i>	188
8.4.7	<i>Implementation of Taguchi design</i>	189
8.4.8	<i>Data analysis and optimization</i>	190
8.4.9	<i>Validation assay</i>	192
8.5	CONCLUSION.....	193
8.6	FUNDING INFORMATIONS.....	193
8.7	ACKNOWLEDGEMENTS	193
8.8	PRESENTATION DES RESULTATS ADDITIONNELS DE L'ARTICLE	194
8.8.1	<i>La production de PHA comme autre réponse étudiée dans le plan d'expérience</i>	194
8.8.2	<i>Bilan de la production des PHA dans le plan d'expérience réalisé</i>	194
8.8.1	<i>Analyse des résultats et optimisation</i>	195
8.8.2	<i>Essai de confirmation</i>	197
8.9	CONCLUSIONS GENERALES	197
9	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	199
10	BIBLIOGRAPHIE	208
11	ANNEXE I. DONNEES BIOLOG	227
12	ANNEXE II. CALCUL DU NOMBRE DE MUTANTS ALEATOIRES A TESTER	229
13	ANNEXE III. ARTICLE EN COLLABORATION	232

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : REPRESENTATION DE LA CORRELATION ENTRE LA TENSION DE SURFACE ET LA CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE D'UN SURFACTANT.	3
FIGURE 1.2 : LES RHAMNOLIPIDES SONT NECESSAIRES A LA MOTILITE DE TYPE SWARMING CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> . 8	8
FIGURE 1.3 : ORGANISATION DES GENES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES RHAMNOLIPIDES CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1. (ADAPTÉ DE HTTP://WWW.PSEUDOMONAS.COM)	14
FIGURE 1.4 : MODELE PROPOSE PAR (LIN ZHANG <i>ET AL.</i> , 2012).....	16
FIGURE 1.5 : MODELE PROPOSE PAR (ABDEL-MAWGOUD <i>ET AL.</i> , 2014)	17
FIGURE 1.6 : MODELE PROPOSE PAR (GUTIERREZ-GOMEZ <i>ET AL.</i> , 2019)	18
FIGURE 1.7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DES GENES <i>RHLA</i> , <i>RHLB</i> ET <i>RHLC</i> DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1, <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 ET <i>B. PSEUDOMALLEI</i> 1710B ...	25
FIGURE 1.8 : LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES PAR LES SIMPLES MUTANTS <i>RHLA1</i> ET <i>RHLA2</i> CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	26
FIGURE 1.9 : LE QS AFFECTE LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	31
FIGURE 1.10 : SCMR REPRIME LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	32
FIGURE 1.11 : STRUCTURE DE GRANULE DE PHA CHEZ <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> (REHM, 2010).....	36
FIGURE 1.12 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DES PHAS.	37
FIGURE 1.13 : LES QUATRE CLASSES DE PHA SYNTHASES	38
FIGURE 1.14 : ORGANISATION TYPE DES GENES CODANT POUR LA BIOSYNTHESE DES PHAS.....	39
FIGURE 1.15 : LES PROCEDES DE FERMENTATION LIQUIDE LES PLUS COMMUNEMENT UTILISES DANS L'INDUSTRIE	45
FIGURE 3.1: OPTICAL DENSITIES AT 600 NM AND CFUS MAY NOT BE CORRELATED IN <i>B. THAILANDENSIS</i> CULTURES.....	54
FIGURE 3.2: <i>PHAC</i> MUTANT OF <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 DO NOT PRODUCE PHAS.	56
FIGURE 3.3: PHA BIOSYNTHESIS IS CORRELATED TO OD ₆₀₀ MEASURES.	57
FIGURE 4.1: RANDOM MUTAGENESIS IDENTIFIES A RHAMNOLIPID OVERPRODUCER OF <i>B. THAILANDENSIS</i> E264. .	68
FIGURE 4.2 : RHAMNOLIPID PRODUCTION AND GROWTH ASSESSMENT OF THE <i>SCMR</i> MUTANT ED1023, THE COMPLEMENTED MUTANT AND THE WILD TYPE STRAIN E264.	70
FIGURE 4.3 : TRANSCRIPTION OF BOTH <i>RHL</i> OPERONS IS INCREASED IN THE <i>SCMR</i> - MUTANT.	72
FIGURE 4.4: <i>SCMR</i> NEGATIVELY AFFECTS PHA BIOSYNTHESIS.	73
FIGURE 4.5: ADDITIONAL FILE 1: EFFECT OF PH ON RHAMNOLIPID BIOSYNTHESIS.....	77
FIGURE 4.6: LA MUTAGENÈSE ALÉATOIRE A IDENTIFIÉ DIFFÉRENTS MUTANTS DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 DONT LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES EST IMPACTÉE.	79
FIGURE 4.7 : CONTEXTE GENOMIQUE DU GENE <i>BETB</i> CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	83
FIGURE 4.8 : LA VOIE METABOLIQUE DE LA GLYCINE-BETAINE	84
FIGURE 4.9 : PRODUCTION DES RHAMNOLIPIDES CHEZ LA SOUCHE E264 CULTIVEE EN MILIEU MINIMAL SUPPLEMENTE OU NON AVEC DE LA CHOLINE	85
FIGURE 4.10 : LE CHOC OSMOTIQUE INHIBE LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.86	86

FIGURE 4.11: EXPRESSION DES OPERONS <i>RHL</i> CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE EN CONDITION FAVORABLE A LA PRODUCTION DE GLYCINE BETAINE	87
FIGURE 4.12 : SUIVI DE LA DO ₆₀₀ PENDANT 6 JOURS CHEZ LE MUTANT BETB (M36) ET LA SOUCHE SAUVAGE (WT)	88
FIGURE 4.13 : NOMENCLATURE DES DIFFERENTS SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VI CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i>	90
FIGURE 5.1: EXPERIMENTAL STRATEGY FOR TRANSFERS IN LIQUID OR AGAR CONTAINING AGAR.	100
FIGURE 5.2 : POPULATIONS ADAPTED TO GROW AND MIGRATE ON PLATES WITH HIGHER AGAR CONCENTRATIONS PRODUCE SUPERIOR CONCENTRATIONS OF RHAMNOLIPIDS.	103
FIGURE 5.3 : RHAMNOLIPID PRODUCTION FOR CLONES SELECTED FROM <i>B. THAILANDENSIS</i> POPULATIONS EVOLVED ON 1.5% AGAR PLATES.	104
FIGURE 5.4 : MUTATION IN <i>QSMR</i> LEADS TO A HYPERSWARMER PHENOTYPE AND OVERPRODUCTION OF RHAMNOLIPIDS.	107
FIGURE 5.5 : BOTH <i>RHL</i> OPERONS OF <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 ARE UPREGULATED IN A <i>QSMR</i> MUTANT.	108
FIGURE 5.6: TRANSCRIPTION OF BTH_I2866 (<i>MDTA</i>) IS MODULATED BY THE <i>QSMR</i> REGULATOR.	109
FIGURE 5.7: SEQUENCE ALIGNMENT AND STRUCTURAL PREDICTIONS OF <i>QSMR</i> MUTANT PROTEINS COMPARED TO THE WILD TYPE PROTEIN.	111
FIGURE 5.8 : SINGLE MUTATION IN <i>MDTABC</i> SYSTEM DID NOT AFFECT RHAMNOLIPID CONCENTRATION IN SUPERNATANT.	115
FIGURE 5.9 : WILD TYPE PHENOTYPE IS RESTORED BY <i>QSMR</i> COMPLEMENTATION.	116
FIGURE 5.10 : ESSAIS DE MOTILITE DE TYPE SWARMING CHEZ LES EVOLUANTS SELECTIONNES DANS CHAQUE LIGNEE.	118
FIGURE 5.11 : ESSAIS DE MOTILITE DE TYPE SWIMMING CHEZ LES EVOLUANTS SELECTIONNES POUR CHAQUE LIGNEE.	119
FIGURE 5.12: MODELISATION DU SITE DE RECONNAISSANCE DU LIGAND DU REGULATEUR <i>QSMR</i>	126
FIGURE 5.13: LA PRODUCTION DE PHA N'EST PAS AFFECTEE CHEZ LE MUTANT <i>QSMR</i> - COMPARE A LA SOUCHE SAUVAGE E264.	128
FIGURE 5.14: IMAGES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE POUR VISUALISER LES PHAS DANS LA SOUCHE SAUVAGE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 (A) ET LE MUTANT <i>QSMR</i> ⁻ (B).	129
FIGURE 6.1: RHAMNOLIPID PRODUCTION IS NOT INCREASED IN THE <i>PHAC</i> - MUTANT COMPARED TO THE WILD-TYPE STRAIN.	138
FIGURE 6.2: PHA BIOSYNTHESIS THE <i>RHLA1/A2</i> MUTANT AND THE WILD TYPE STRAIN E264 DURING 5 DAYS OF CULTURE AT 30°C IN NB MEDIUM SUPPLEMENTED WITH 2% GLYCEROL.	139
FIGURE 6.3: RHAMNOLIPID AND PHA PRODUCTIONS IN THE <i>PHAR</i> - MUTANT DURING 5 DAYS OF CULTURE AT 30°C IN NB MEDIUM SUPPLEMENTED WITH 2% GLYCEROL.	141
FIGURE 6.4: RELATIVE EXPRESSION OF <i>PHAC</i> AND <i>PHAZ</i> IN <i>PHAR</i> MUTANT COMPARED TO THE WILD TYPE STRAIN AT DAY1, DAY 2 AND DAY 3.	142
FIGURE 6.5 : HYPOTHETICAL MODEL FOR PHA BIOSYNTHESIS IN <i>B. THAILANDENSIS</i> FOR THE WILD-TYPE STRAIN AND THE <i>PHAR</i> - MUTANT.	146
FIGURE 6.6 : LES MUTANTS DES GENES CODANT POUR LA BIOSYNTHESE DES PHA PRODUISENT MOINS DE RHAMNOLIPIDES QUE LA SOUCHE SAUVAGE E264.	149
FIGURE 6.7: LE MUTANT DU GENE CODANT POUR LE REGULATEUR <i>PHAR</i> PRODUIT PLUS DE RHAMNOLIPIDES QUE LA SOUCHE SAUVAGE E264.	150

FIGURE 6.8 : LE MUTANT DU GENE CODANT POUR LA DEPOLYMERASE PHAZ PRODUIT MOINS DE RHAMNOLIPIDES QUE LA SOUCHE SAUVAGE E264.	152
FIGURE 7.1 : RHAMNOLIPID AND PHA PRODUCTION ARE QS-CONTROLLED.	160
FIGURE 7.2 : THE QS-3 AFFECTS BOTH PHA AND RHAMNOLIPID PRODUCTIONS.....	161
FIGURE 7.3: QS ACTIVATES THE TRANSCRIPTION OF <i>SCMR</i>	163
FIGURE 7.4 : CINÉTIQUES DE PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES DANS LES MUTANTS COMBINÉS DES SYSTÈMES DE QS ET <i>SCMR</i> (ALORS APPELÉ <i>HMQR</i>) PAR RAPPORT À LA DO_{600}	169
FIGURE 7.5 : BILAN DES INTÉRACTIONS ENTRE LE QS1, QS3, SCMR ET LES SYSTÈMES DE PRODUCTION DE PHAS ET DE RHAMNOLIPIDES.	171
FIGURE 8.1: REPARTITION OF THE FACTORS IN THE TAGUCHI'S DESIGN L16.....	179
FIGURE 8.2: GROWTH EVALUATION OF THE E264 STRAIN IN DIFFERENT MINIMAL MEDIA.....	182
FIGURE 8.3: FINAL POINT OF OD_{545} FOR <i>B. THAILANDENSIS</i> CULTURED IN DIFFERENT FEEDSTOCKS	183
FIGURE 8.4: OD_{600} AND RHAMNOLIPID PRODUCTION IN <i>B. THAILANDENSIS</i> AFTER 5 DAYS OF CULTIVATION IN MINIMAL MEDIUM WITH DIFFERENT FEEDSTOCKS AT 37°C.....	184
FIGURE 8.5: GROWTH EVALUATION OF <i>B. THAILANDENSIS</i> CULTURED IN MINIMAL MEDIUM WITH 2, 4, 6 OR 8% ETHANOL.....	185
FIGURE 8.6: ETHANOL IS THE LIMITING FACTOR WHEN <i>B. THAILANDENSIS</i> IS CULTURED IN MINIMAL MEDIUM WITH 2% ETHANOL.....	186
FIGURE 8.7: OD_{600} MEASUREMENTS (A) AND PRODUCTION OF RHAMNOLIPIDS (B) FOR <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES.....	187
FIGURE 8.8 : PRODUCTION OF RHAMNOLIPIDS FOR <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 GROWN ON DIFFERENT NITROGEN (A) OR PHOSPHORUS (B) SOURCES.....	188
FIGURE 8.9: EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS OF THE L16 TAGUCHI TABLE FOR RHAMNOLIPID PRODUCTION.	189
FIGURE 9.1 : SCHÉMA GÉNÉRAL DES RÉGULATEURS MIS EN ÉVIDENCE PENDANT LE DOCTORAT	205
FIGURE 12.1 COURBE REPRESENTANT LE NOMBRE DE GENES N'AYANT PAS SUBI DE TRANSPOSITION EN FONCTION DU NOMBRE DE MUTANTS CONSIDERES.	230

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1: NATURE DES BIOSURFACTANTS.....	4
TABLEAU 1.2 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS CONGENERES DE RHAMNOLIPIDES DECRITS DANS LA LITTERATURE.....	6
TABLEAU 1.3: DESCRIPTION DES ESPECES DU GENRE <i>BURKHOLDERIA</i> DECRITES COMME PRODUCTRICES DE RHAMNOLIPIDES	12
TABLEAU 4.1: STRAINS AND PLASMID USED IN THIS STUDY.	63
TABLEAU 4.2 : THE TRANSPOSON IS INSERTED IN THE BTH_I1403 LOCUS FOR M63 MUTANT.	69
TABLEAU 4.3 : IDENTIFICATION DES SITES D'INSERTION DU TRANSPOSON A PARTIR DES SEQUENCES UNIQUES OBTENUES PAR TRAITEMENT DES DONNEES TnSEQ.....	80
TABLEAU 4.4 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION DES MUTANTS ALEATOIRES.....	81
TABLEAU 4.5 : IDENTIFICATION DES MUTATIONS DANS CHACUN DES MUTANTS SELECTIONNES.....	82
TABLEAU 5.1 : STRAINS AND PLASMIDS USED IN THIS STUDY	97
TABLEAU 5.2: PRIMERS USED FOR QRT-PCR.....	102
TABLEAU 5.3: MUTATIONS FOUND IN EVOLVED CLONES OF <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 DISPLAYING INCREASED THE RHAMNOLIPID PRODUCTION.....	105
TABLEAU 5.4 : COMPARAISON DES SEQUENCES PROTEIQUES LIEE A LA MUTATION DANS LE GENE BTH_I2820 PAR RAPPORT A LA SOUCHE E264.....	120
TABLEAU 5.5 : COMPARAISON DES SEQUENCES PROTEIQUES LIEE A LA MUTATION DANS LE GENE BTH_II0885 PAR RAPPORT A LA SOUCHE E264.....	123
TABLEAU 5.6: ENERGIES ASSOCIEES A L'INTERACTION ENTRE LES HOMO-SERINES LACTONES ET LE SITE DE RECONNAISSANCE DU LIGAND DE QSMR	126
TABLEAU 6.1: STRAINS USED IN THIS STUDY:	135
TABLEAU 6.2: PRIMERS USED FOR QRT-PCR.....	137
TABLEAU 6.3 : IDENTIFICATION OF THE GENES INVOLVED IN THE PHA METABOLISM IN <i>B. THAILANDENSIS</i>	140
TABLEAU 6.4 : SOUCHES SUPPLEMENTAIRES UTILISEES POUR CETTE ETUDE.....	148
TABLEAU 7.1 : STRAINS USED IN THIS STUDY	157
TABLEAU 7.2: PRIMERS USED FOR QRT-PCR.....	158
TABLEAU 8.1: PHOSPHATES CONCENTRATION USED FOR THE DIFFERENT TESTED COMBINATIONS.....	178
TABLEAU 8.2: EXPERIMENTAL DESIGN OF THE L16 TAGUCHI TABLE (“-“=ABSENCE; “+“=PRESENCE).....	180
TABLEAU 8.3: EFFECT OF EACH FACTOR IN THE L16 DESIGN ON THE RHAMNOLIPID PRODUCTION BY <i>B. THAILANDENSIS</i> E264	191
TABLEAU 8.4: EFFECT ASSOCIATED TO THE FACTOR CORRESPONDING TO INTERACTIONS IN THE CHOSEN TAGUCHI'S DESIGN.	191
TABLEAU 8.5: BEST COMBINATION FOR THE OPTIMIZATION OF RHAMNOLIPID PRODUCTION.....	192
TABLEAU 8.6: EXPERIMENTAL VALUES OF RESPONSES UPON USING OPTIMUM CONDITIONS AS PREDICTED BY TAGUCHI DESIGN.....	192
TABLEAU 8.7: EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS OF THE L16 TAGUCHI TABLE FOR PHA PRODUCTION.	194

TABLEAU 8.8: EFFET ASSOCIÉ À CHACUN DES FACTEURS TESTÉS.....	196
TABLEAU 8.9: EFFET ASSOCIÉS AUX INTERACTIONS ENTRE FACTEURS.....	196
TABLEAU 8.10: IDENTIFICATION DE LA MEILLEURE COMBINAISON DE FACTEUR POUR UNE PRODUCTION DE PHA THÉORIQUE OPTIMALE.....	197
TABLEAU 8.11: RÉSULTAT DE LA QUANTIFICATION DES PHAS DE L'ESSAI DE CONFIRMATION	197
TABLEAU 12.1 : RECAPITULATIF DE LA FREQUENCE DE GENES TOUCHES ET DU NOMBRE DE GENES RATES SELON LE NOMBRE DE TRANSPOSANTS CONSIDERES. SIMULATION DE MUTAGENESE ALEATOIRE REALISEE POUR B. THAILANDENSIS	229

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
3OC ₈ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-octanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₁₀ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-décanoyl)-L-homosérine lactone
ACP	Protéine porteuse d'acyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acyl homosérine lactone
AI	Auto-inducteur
AMP	Adénosine monophosphate
Amp ^R	Résistance à l'ampiciline
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bla	beta-lactamase
<i>Bptm</i>	<i>Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei</i>
CMC	Concentration micellaire critique
C ₈ -HSL	Octanoyl homosérine lactone
CL/SM ou LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CoA	Coenzyme A
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
dTDP	Deoxythymidine diphosphate
DO ₆₀₀ ou OD ₆₀₀	Densité optique à une longueur d'onde de 600 nm
FAS II	Voie métabolique de synthèse <i>de novo</i> des acides gras
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur à ionisation de flamme
HAA	Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinoline
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HSL	Homosérine lactone
Kla	coefficient volumétrique de transfert d'oxygène
KmR	Résistance à la kanamycine

kDa	Kilodalton
kV	Kilovolts
L	Litre
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MNR	Résonance magnétique nucléaire
NB	Nutrient broth
nM	Nanomolaire
nm	Nanomètre
nmol	Nanomole
pb	Paires de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pH	Potentiel hydrogène
PHA(s)	Polyhydroxyalkanoate(s)
ppm	Particules par million
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal. (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline)
qRT-PCR	« Quantitative reverse transcription-PCR »
QS	<i>Quorum sensing</i>
RL(s)	Rhamnolipide (s)
RNA-Seq	« RNA-Sequencing »
rpm	Rotations par minute
RT	Transcription inverse
Rha	Rhamnose
Tc ^R	Résistance à la tétracycline
TEM	Microscopie électronique à transmission
TES	Solution d'éléments trace
TLC	Chromatographie en couche mince
Tp ^R	Résistance à la triméthopime
TSB	Bouillon tryptone soja
UFC(ou CFU)	Unité formatrice de colonie

V

Volt

1 INTRODUCTION

1.1 Les surfactants

1.1.1 Définition et propriétés

Par définition, un surfactant, également nommé agent tensioactif, est un composé qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces ou phases.

Ces composés sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente. En effet, on parle d'une queue étant lipophile (qui a une affinité pour les matières hydrophobes) et apolaire, et d'une tête hydrophile (miscible dans l'eau) et polaire.

Deux phases non miscibles peuvent donc être solubilisées en ajoutant des surfactants, qui interagissent par leur partie hydrophobe d'une part avec la phase apolaire (c'est-à-dire lipophile donc hydrophobe), et par leur partie hydrophile d'autre part avec la phase polaire.

C'est la structure amphiphile des agents tensioactifs qui leur confère une affinité particulière pour les interfaces de type huile/eau et eau/huile. Ainsi, les surfactants ont la capacité d'abaisser l'énergie libre de ces interfaces en permettant la formation de gouttes lors d'une émulsification par exemple.

Afin de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe majoritaire, on peut estimer la valeur de leur HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, balance hydrophile/hydrophobe), qui permettra d'évaluer numériquement cet équilibre entre partie lipophile et partie hydrophile.

1.1.2 Classification des surfactants d'origine chimique

La plupart des surfactants commercialisés à l'heure actuelle sont des dérivés de l'industrie pétrochimique. Ils sont généralement classés en fonction de la nature chargée ou non de leur groupement hydrophile ou polaire. Ainsi les surfactants seront décrits comme non ioniques, anioniques, cationiques ou encore zwitterioniques, c'est-à-dire portant à la fois une charge positive et une charge négative (Myers, 2005).

1.1.3 Notion de tension de surface

Une surface de contact entre deux milieux différents représente une interface, dont la création est toujours accompagnée d'une consommation d'énergie. Cette énergie de surface est égale à l'aire de la surface multipliée par une quantité appelée tension de surface ou encore tension superficielle. Ainsi, la tension de surface, exprimée en Newton par mètre ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) ou joules par mètre carré ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$), correspond à une force ou une énergie qu'il faut appliquer à un liquide pour engendrer l'extension de sa surface (Rosen *et al.*, 2012). De ce fait, moins la tension superficielle est haute, moins il faut mettre de force pour amener à une extension de la surface.

1.1.4 Concentration micellaire critique

Du fait de sa structure amphiphile, un agent tensioactif possède des propriétés particulières : il peut migrer aux interfaces. Sa capacité à abaisser la tension superficielle détermine son efficacité (Rosen *et al.*, 2012).

La concentration micellaire critique (CMC) est propre à chaque surfactant et représente la concentration à laquelle l'interface est complètement saturé en molécules de surfactants, entraînant la formation spontanée de structures secondaires telles que les micelles, les doubles couches ou encore les vésicules.

Lin *et al.* (Lin, 1996) définissent la CMC comme la concentration minimale d'un surfactant requise pour atteindre la valeur de tension de surface la plus basse (**Fig. 1.1**). La CMC traduit donc l'efficacité d'un surfactant puisqu'une valeur basse de la CMC d'un surfactant correspond en fait à une faible concentration nécessaire pour abaisser la tension de surface (Becher, 1965).

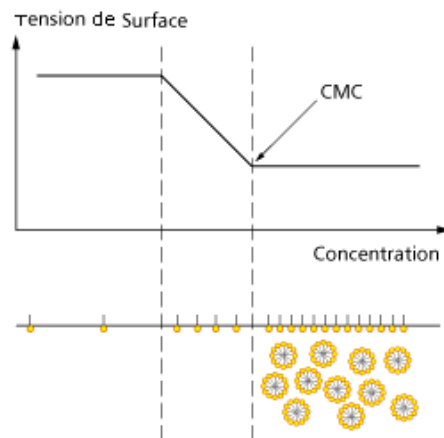


Figure 1.1 : Représentation de la corrélation entre la tension de surface et la concentration micellaire critique d'un surfactant.

Cependant, certains paramètres peuvent amener à des variations de la valeur de la CMC, notamment le pH, la température ou encore la force ionique (Mulligan *et al.*, 2004, Murata *et al.*, 1997, Pandit *et al.*, 1989, Sugihara *et al.*, 1982).

1.1.5 Les surfactants d'origine biologique

Le marché mondial des agents tensioactifs est en pleine expansion. Actuellement, la plupart de ces surfactants sont d'origine chimique, dérivés du pétrole. Dans un souci écologique et de santé, les études se portent de plus en plus vers les biosurfactants, c'est-à-dire des agents tensioactifs d'origine biologique, soit d'origine végétale, soit dont la production peut être réalisée par fermentation microbienne, par exemple. En effet, les biosurfactants sont produits naturellement par une grande diversité de bactéries (Desai *et al.*, 1997a) même s'il est bien connu que d'autres microorganismes sont capables de synthétiser des biosurfactants tels que les levures ou les champignons filamenteux. Les biosurfactants présentent plusieurs avantages par rapport à leurs homologues chimiques. Parmi eux, on compte par exemple une toxicité plus basse, une meilleure biodégradabilité (Mohan *et al.*, 2005), une sélectivité plus haute et une activité spécifique dans des conditions de température, pH et salinité extrêmes (Pooja Singh *et al.*, 2004).

Alors que les surfactants d'origine chimique sont généralement classés en fonction de leur groupe polaire, les biosurfactants le sont selon leur composition chimique mais aussi leur origine microbienne (**Tableau 1.1**). Leur structure peut être décomposée en une partie hydrophile (peptides chargés positivement ou négativement, mono ou disaccharides) et une partie hydrophobe (acides gras, chaîne saturée ou insaturée).

Plusieurs classes de biosurfactants ont ainsi été mises en évidence : les glycolipides, les lipopeptides et lipoprotéines, les phospholipides et les acides gras, les biosurfactants polymériques et les surfactants particuliers (Desai *et al.*, 1997a).

Tableau 1.1: Nature des biosurfactants

Biosurfactants	Exemples d'organismes producteurs	Références
Glycolipides		
<i>Rhamnolipides</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hisatsuka et al (1971)
<i>Tréhalolipides</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Margaritis et al (1979)
<i>Sophorolipides</i>	<i>Candida apicola</i>	Gobbert et al (1984)
Lipopeptides et lipoproteines		
<i>Peptide-lipide</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	Javaheri et al (1985)
<i>Viscosine</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Laycock et al (1991)
<i>Surfactin</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Bernheimer et Avigad, (1970)
Acides gras, lipides neutres et phospholipides		
<i>Acides gras</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>	Cooper et al (1981)
<i>Lipides neutres</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kretschmer et al (1982)
<i>Phospholipides</i>	<i>Thiobacillus thiooxydans</i>	Knickerbocker et al (2000)
Surfactants polymériques (ou émulsifiants)		
<i>Emulsan</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rosenberg et Ron (1999)
<i>Biodispersan</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	E. Rosenberg et al (1988)
Surfactants radicalaires		
<i>Vésicule et fimbriae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Kappeli et Finnerty (1979)

Parmi les glycolipides, la catégorie de biosurfactants la mieux connue, trois catégories se distinguent principalement : les sophorolipides, les tréhalolipides et plus particulièrement les rhamnolipides, la différence résidant dans la nature du sucre pour la partie hydrophile de la molécule.

1.2 Les rhamnolipides

1.2.1 Structure

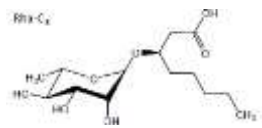
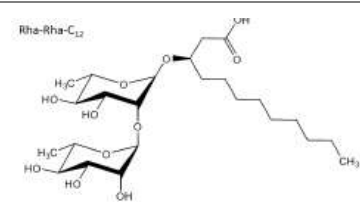
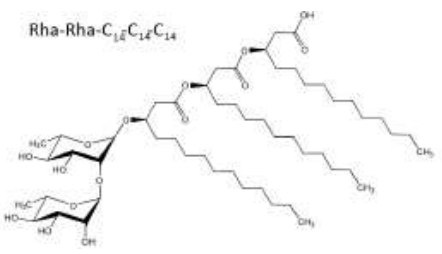
Les rhamnolipides sont constitués d'une ou de deux molécules de L-rhamnose liée(s) par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique à des acides gras β -hydroxylés (Déziel *et al.*, 1999). Ils ont été pour la première fois mis en évidence en 1946 par Bergström et al. (Bergström *et al.*, 1947), qui rapportaient la production en milieu glucose d'un glycolipide huileux par *P. aeruginosa*, nommée à ce moment-là *Pseudomonas pyocyanea*. Ce glycolipide a été nommé acide pyolipique, et des études ultérieures ont montré que ce surfactant était composé de L-rhamnose et d'acide β -hydroxydécanoïque (Hauser *et al.*, 1957, Jarvis *et al.*, 1949).

Différents congénères de rhamnolipides existent, appartenant à l'un des principaux groupes suivants : les mono-rhamnolipides et les di-rhamnolipides. Par ailleurs, le nombre de chaînes d'acides gras ainsi que leur longueur peuvent varier (**Tableau 1.2**).

Une nomenclature a été mise en place dans le but de simplifier l'écriture chimique des rhamnolipides. Ainsi, le diminutif « Rha » est utilisé pour symboliser, les rhamnoses et « C_n » permet de décrire les chaînes d'acide gras et leur longueur (en nombre de carbones : n). Etant donné que les acides gras peuvent être insaturés, le code « C_{n;x} » est alors employé, où x indique le nombre d'insaturations.

Par exemple, le principal congénère produit par *P. aeruginosa* se symbolise par Rha-Rha-C₁₀-C₁₀.

Tableau 1.2 : Récapitulatif des différents congénères de rhamnolipides décrits dans la littérature.

écriture	Longueurs et insaturations des chaînes		Exemple de structure
Congénères mono-rhamno-mono-lipidiques			
Rha-Cn	n = 8-10-12		
Rha-Cn:x	n = 8-10-14	x = 2	
Congénères mono-rhamno-di-lipidiques			
Rha-Cn ₁ -Cn ₂	n ₁ = 8-10-12-14-16	n ₂ = 8-10-12-14-16	
Rha-Cn ₁ :x-Cn ₂	n ₁ = 10-12	x=1	n ₂ = 8-10
Rha-Cn ₁ -Cn ₂ :x	n ₁ = 8-10-12	n ₂ = 10-12-14	x=1
Congénères di-rhamno-mono-lipidiques			
Rha-Rha-Cn	n = 8-10-12-14		
Rha-Rha-C12:1	n=12	x=1	
Congénères di-rhamno-di-lipidiques			
Rha-Rha-Cn ₁ -Cn ₂	n ₁ = 8-10-12-14-16	n ₂ = 8-10-12-14-16	
Rha-Rha-Cn ₁ :x-Cn ₂	n ₁ =12	x=1	n ₂ = 8-10-12
Rha-Rha-Cn ₁ -Cn ₂ :x	n ₁ = 8-10-12	n ₂ =10-12-14	x=1
Congénères di-rhamno-tri-lipidiques			
Rha-Rha-C14-C14-C14	n=14		

n représente le nombre de carbones et x le nombre d'insaturations dans la chaîne d'acide gras considérée. Adapté de Abdel-Mawgoud *et al* (2010)

1.2.2 Rôle chez les organismes producteurs

Bien que la plupart des études de rhamnolipides aient été menées sur *P. aeruginosa*, les fonctions identifiées sont probablement aussi présentes chez les autres espèces bactériennes productrices de rhamnolipides.

1.2.2.1 Solubilisation des substrats hydrophobes

L'assimilation de substrats hydrophobes en culture liquide est facilitée par la présence de rhamnolipides, du fait de leurs propriétés tensioactives. Cet effet « solubilisateur » a été plus particulièrement observé pour l'assimilation des hydrocarbures de type n-alcane (Beal *et al.*, 2000). De ce fait, les bactéries produisant des rhamnolipides sont en mesure de dégrader différents substrats hydrophobes (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010), ouvrant ainsi la voie pour la mise en place de procédés de biorestauration des sols par exemple (Whang *et al.*, 2008).

1.2.2.2 La motilité de type *swarming*

Rashid et Kornberg ont identifié la motilité de type *swarming* en 2000 chez *P. aeruginosa* (Rashid *et al.*, 2000). Cette motilité peut être définie comme étant une forme rapide et coordonnée de translocation d'une population bactérienne sur une surface semi solide, le plus souvent grâce à la formation de dendrites qui ne se rencontrent jamais (Verstraeten *et al.*, 2008). Harshey et al (2003) ont identifié les conditions nécessaires à la motilité de type *swarming* : un allongement et une hyperflagellation des cellules et la sécrétion d'une matrice composée d'exopolysaccharides et de surfactants. Cette matrice constitue en fait un agent mouillant permettant de réduire la tension de surface entourant la colonie et donc de favoriser la motilité (Matsuyama *et al.*, 1996). Par exemple, la motilité de type *swarming* a été étudiée chez *P. aeruginosa*, dans laquelle l'inactivation des gènes responsables de la biosynthèse des rhamnolipides entraîne l'inhibition de la motilité (**Figure 1.2**) (Köhler *et al.*, 2000). Le même phénomène a été observé chez d'autres espèces bactériennes comme *B. thailandensis* (Dubeau et al., 2009), confirmant que les rhamnolipides représentent un élément nécessaire pour la motilité de type *swarming*.

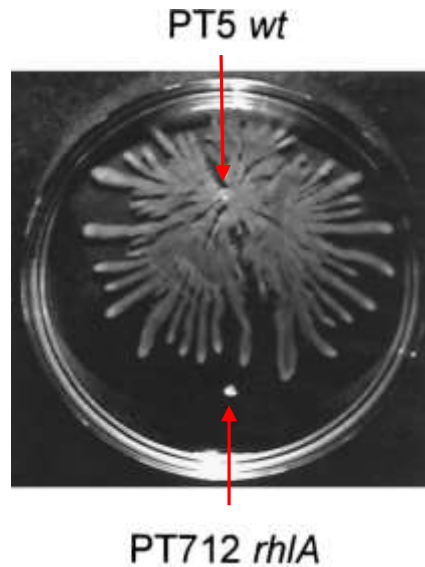


Figure 1.2 : Les rhamnolipides sont nécessaires à la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*

La souche sauvage de *P.aeruginosa* PT5 et le mutant *rhlA*- PT712 ont été inoculés sur la même boîte de pétri et incubés pendant 24h à 37°C (adapté de (Köhler *et al.*, 2000)).

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les rhamnolipides interviennent différemment dans le *swarming* selon leur nature. En effet, les mono-rhamnolipides jouent essentiellement le rôle d'agents mouillants, alors que les di-rhamnolipides stimulent la formation de dendrites ainsi que la migration des cellules (Tremblay *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Les facteurs de virulence

Comme décrit précédemment, les rhamnolipides ont été mis en évidence pour la première fois chez *P. aeruginosa*. Cette bactérie est un pathogène opportuniste responsable de diverses infections, en particulier chez des individus immunodéprimés. Plusieurs études tendent à prouver l'implication des rhamnolipides dans ces infections en tant que facteurs de virulence. Plus précisément, les biosurfactants assureraient la fixation de la bactérie sur les cellules épithéliales facilitant ainsi le développement de l'infection (Zulianello *et al.*, 2006).

Les rhamnolipides sont entre autres impliqués dans :

- L'activité hémolytique thermo-tolérante (Sierra, 1960)
- L'inhibition des fonctions ciliaires de l'épithélium bronchial (Hingley *et al.*, 1986)

- L'induction de l'activité chimiotactique des neutrophiles en stimulant la réponse oxydative des cellules (Kharazmi *et al.*, 1989)
- L'inhibition de la réponse phagocitaire (McClure *et al.*, 1996)

1.2.2.4 L'activité antimicrobienne

Les rhamnolipides possèdent des propriétés antimicrobiennes envers un grand nombre de bactéries, particulièrement les bactéries à Gram- positif (Itoh *et al.*, 1971, Lang *et al.*, 1989) , mais aussi contre certains champignons puisque des effets inhibiteurs ont été observés (Abalos *et al.*, 2001, Haba *et al.*, 2003). Bien que l'aspect mécanistique de l'action des rhamnolipides n'ait pas été décrit *in vitro* ou *in vivo*, une analogie avec les surfactants synthétiques suggérerait une action ciblée au niveau de l'enveloppe cellulaire. Ainsi, ils pourraient s'intercaler dans la membrane et de ce fait entraîner la destruction cellulaire par leurs effets perméabilisants (Sotirova *et al.*, 2008).

1.2.2.5 La formation de biofilms

Dans l'environnement, les bactéries sont organisées en communautés complexes appelées biofilms. Les biofilms interviennent dans divers mécanismes de protection notamment par rapport aux défenses de l'hôte lors d'infections, ou vis-à-vis d'autres bactéries indésirables, mais aussi face aux éventuels traitements antibiotiques.

La motilité de type *swarming* et la formation de biofilms seraient étroitement liés. En effet, une altération de la motilité, que ce soit une inhibition ou une suractivation, entraîne une déficience dans la formation de biofilm mature (Caiazza *et al.*, 2007, Harshey, 2003, Verstraeten *et al.*, 2008), suggérant que la motilité de type *swarming* serait une étape importante dans la formation d'un biofilm. De plus, leur rôle diffère selon leur emplacement au sein du biofilm. En effet, Lequette et Greenberg (2005) ont montré que dépendamment de l'emplacement des cellules dans la structure du biofilm, la modulation des gènes codant pour la production de rhamnolipides est différente.

D'autre part, les rhamnolipides semblent responsables du maintien de canaux à l'intérieur du biofilm, permettant de cette façon l'approvisionnement continu des éléments nutritifs et de l'oxygène nécessaires aux bactéries (Davey *et al.*, 2003)

La sécrétion de lipopolysaccharides serait également induite par les rhamnolipides, qui joueraient aussi le rôle de médiateurs des changements d'interactions adhésives, spécialement lors de modification des conditions nutritionnelles se modifient (Al-Tahhan *et al.*, 2000).

Ainsi, ils interviennent aussi bien dans les phases initiales du développement des biofilms via la formation de micro-colonies, que dans la dissémination du biofilm mature (Pamp *et al.*, 2007).

1.2.3 Les organismes producteurs

Le principal producteur de rhamnolipides a souvent été décrit comme étant le pathogène *P. aeruginosa*. Cependant, au cours des dernières années, plusieurs autres espèces bactériennes ont démontré leur potentiel de production de rhamnolipides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010); appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*, mais aussi *Thermus* et *Meiothermus* (Řezanka *et al.*, 2011). Nous nous concentrerons ici sur les genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*.

1.2.3.1 Le genre *Pseudomonas*

- ***Pseudomonas aeruginosa***

P. aeruginosa est une γ -protéobactérie, membre de la famille des *Pseudomonadaceae* (Van Delden *et al.*, 1998). C'est un pathogène opportuniste qui infecte en général les personnes immunodéprimées et les individus atteints de fibrose kystique. Elle peut aussi être la cause d'infections nosocomiales (Doggett *et al.*, 1964, Van Delden *et al.*, 1998). Elle possède une large gamme de facteurs de virulence, comme des protéases, des exotoxines, des phospholipases, le cyanure d'hydrogène, les rhamnolipides, etc. (Van Delden et Iglewski, 1998).

Dans le cadre de l'étude de la production de rhamnolipides, le fait que la bactérie soit pathogène implique la mise en place de mesures confinement de niveau 2, ce qui peut être un frein pour les compagnies désireuses de mettre en place des bioprocédés dédiés à la production de rhamnolipides à plus grande échelle. C'est pourquoi d'autres bactéries du genre *Pseudomonas* ou *Burkholderia* sont de plus en plus étudiées et décrites dans la littérature.

- ***Pseudomonas chlororaphis***

P. chlororaphis est une bactérie aérobie, mésophile. L'environnement naturel de cette bactérie est le sol, où elle secrète des antibiotiques type phénazine. Du fait de son caractère non pathogène, Gunther *et al.* (Gunther *et al.*, 2005) ont réalisé des expériences visant à produire des

rhamnolipides dans la souche NRRL B-30761, en milieu glucose. La production de rhamnolipides associée avoisinant celle de *P. aeruginosa* (1 g/L contre 1,6 g/L) dans les conditions testées, *B. chlororaphis* serait compatible pour des applications et des procédés de production simplifiés. L'analyse des rhamnolipides produits a montré la présence de monorhamnolipides, ce qui est un indicateur de l'absence du gène *rhIC* responsable de la synthèse des dirhamnolipides (voir **Section 1.2.4.1**).

- ***Pseudomonas putida***

P. putida est une bactérie à Gram-négatif, aérobie que l'on trouve dans divers environnements, mais considérée indigène du sol et des eaux fraîches. Elle est motile à la surface de l'eau grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles.

Dans la littérature, peu de souches ont été décrites comme pouvant produire naturellement des rhamnolipides, à savoir la souche *P. putida* BN21 (Tuleva *et al.*, 2002) et *P. putida* CB-100 (Martinez-Toledo *et al.*, 2006).

1.2.3.2 Le genre *Burkholderia*

C'est en se basant sur la séquence nucléotidique des ARNr 16S, sur les homologies de séquence ADN-ADN, sur la composition lipidique et sur les caractéristiques phénotypiques que sept espèces appartenant au groupe d'homologie II du genre *Pseudomonas* ont été reclassées dans un nouveau genre, donnant naissance au genre *Burkholderia* en 1992 (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Le génome de ce genre étant très dynamique, de nouvelles espèces sont régulièrement découvertes (Martina *et al.*, 2017, Peeters *et al.*, 2016, Takeshita *et al.*, 2018, Weber *et al.*, 2017). Actuellement, le genre *Burkholderia* recense environ 122 espèces (<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>) parmi lesquelles quelques-unes ont été recensées pour leur capacité à produire des rhamnolipides, comme par exemple l'agent pathogène des mammifères *Burkholderia pseudomallei*, son homologue non pathogène *Burkholderia thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009), et les deux bactéries phytopathogènes *Burkholderia plantarii* (Andrä *et al.*, 2006) et *Burkholderia glumae* (Costa *et al.*, 2011).

La production de rhamnolipides par ces espèces est présentée dans le **Tableau 1.3**.

Tableau 1.3: Description des espèces du genre *Burkholderia* décrites comme productrices de rhamnolipides

(Inspiré de Kosaric, 2014)

<i>Burkholderia</i> spp	Source de carbone	Rendement de production de rhamnolipides	Congénères les plus abondants	Valeurs de CMC	Références
<i>B. thailandensis</i> E264	Glycérol	419,1 mg/L	Rha-Rha-C14-C14	225 mg/L	Dubeau et al (2009)
	Huile de canola	1473 mg/L			
<i>B. kururiensis</i> KP23	Glycérol	780 mg/L	Variabilité	180-200 mg/L	Tavares et al (2013)
<i>B. plantarii</i> DSM9509	Glucose	45,74 mg/L	Rha-Rha-C14-C14	15-20 mg/L	Hoermann et al (2010)
<i>B. glumae</i> AU6208	Huile de canola	1000,7 mg/L	Variabilité	25-27 mg/L	Costa et al (2011)

Au vu des données présentées, *B. thailandensis* semble être le meilleur candidat pour une production optimale en condition non pathogène du fait des hauts rendements de production observés et de la présence d'un congénère majoritaire. Toutefois, les conditions de culture permettant la production de quantités significatives et suffisantes de rhamnolipides devront être préalablement définies. En effet, en dépit des avantages apparents que présentent ces producteurs de rhamnolipides, la biosynthèse des rhamnolipides chez ces espèces bactériennes reste très peu connue.

1.2.3.3 Les systèmes hétérologues

L'expression hétérologue consiste en l'expression d'un matériel génétique dans un organisme hôte, qui ne possède pas naturellement le gène ou son fragment. Les premiers tests d'expression hétérologues pour la production de rhamnolipides ont été réalisés sur *P.*

fluorescens, *P. putida* et *E. coli* (Ochsner *et al.*, 1995). Ainsi, les gènes codant pour la biosynthèse des rhamnolipides de *P. aeruginosa*, à savoir *rhlAB* (voir **Section 1.2.4**), ont été introduits et exprimés dans ces trois hôtes et la production de rhamnolipides a été évaluée. Dans cette étude, la meilleure production a été obtenue avec *P. putida* avec 0,6g/L de rhamnolipides produits, ouvrant la voie à de nombreuses études d'expression hétérologue dans cette bactérie.

Il faut noter que *P. aeruginosa* et *P. putida* présentent 85 % d'homologie, et que *P. putida* ne possède pas les gènes codant pour les principaux facteurs de virulence retrouvés chez *P. aeruginosa* (Nelson *et al.*, 2002), ce qui permet de s'abroger des contraintes de confinement de niveau 2 liées à l'utilisation de *P. aeruginosa*. De ce fait, *P. putida* se révèle être un bon hôte pour des systèmes hétérologues visant à intégrer la machinerie génétique de *P. aeruginosa* (Loeschcke *et al.*, 2015). En effet, ce sont bien souvent les gènes *rhlAB* de *P. aeruginosa* qui sont utilisés pour ce genre de stratégie (Beuker *et al.*, 2016, Wigneswaran *et al.*, 2016, Wittgens *et al.*, 2011). Malheureusement, malgré l'intérêt que représentent les systèmes hétérologues, les rendements de production obtenus restent inférieurs à ceux obtenus dans la souche originale de *P. aeruginosa*.

Les gènes codant pour la biosynthèse de rhamnolipides chez d'autres bactéries, présentant des propriétés différentes, ont également été testés dans le cadre de systèmes hétérologues. Par exemple, les gènes de biosynthèse des rhamnolipides trouvés chez *B. glumae* ont été exprimés chez *P. putida*, afin de produire des rhamnolipides à chaînes lipidiques comportant 14 carbones (Wittgens *et al.*, 2018).

D'autres organismes ont aussi été explorés comme hôte potentiels pour l'expression des gènes codant la biosynthèse des rhamnolipides. Cité précédemment (Ochsner *et al.*, 1995), *E. coli*, lors des premiers essais n'a pas permis la production de rhamnolipides du fait d'un manque de disponibilité en rhamnose. Une étude ultérieure a permis de mettre en évidence que les gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse du rhamnose (*rmIBDAC*) étaient absents chez *E. coli* et devaient être co-exprimés avec les gènes *rhlAB* (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Enfin, plus récemment, des essais ont été réalisés en utilisant la levure *S. cerevisiae* en tant qu'hôte en introduisant la machinerie génétique pour exprimer les enzymes impliquées aussi bien dans la synthèse du rhamnose que celle des rhamnolipides (Bahia *et al.*, 2018). Cependant, la quantification des rhamnolipides n'ayant été faite que de façon indirecte, *via* une méthode de quantification des acides gras dans la cellule, il est difficile de conclure avec fiabilité au succès de cette étude.

1.2.4 La biosynthèse des rhamnolipides

P. aeruginosa étant le microorganisme le plus étudié pour la production des rhamnolipides, la plupart des informations présentées ici ont été documentées à partir d'études menées sur cette bactérie.

1.2.4.1 Enzymes impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides et organisation génétique.

Plusieurs études menées chez *P. aeruginosa* ont permis d'identifier les mécanismes de biosynthèse des rhamnolipides et de ce fait les enzymes impliquées dans la production de ces métabolites (Burger *et al.*, 1962, Ochsner *et al.*, 1995, Rahim *et al.*, 2001, Soberón-Chávez *et al.*, 2005). En effet, la biosynthèse des rhamnolipides serait possible grâce à la succession de trois réactions impliquant des enzymes distinctes : RhIA, RhIB et RhIC (K Zhu *et al.*, 2008). Ainsi, dans un premier temps, l'enzyme RhIA catalyse une réaction d'estérification menant à la dimerisation de β -hydroxyacyl-ACP (HA-ACP) pour donner des acides 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alcanoïques (HAA)(Soberon-Chavez *et al.*, 2005). La deuxième réaction est catalysée par RhIB, qui est caractérisée comme étant une rhamnosyltransférase. Cette dernière est responsable du couplage d'un sucre activé, le dTDP-L-rhamnose, à un des HAAs produits par RhIA pour donner des mono-rhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994). Enfin, RhIC, qui est aussi une rhamnosyltransférase, permet que les mono-rhamnolipides produits conjointement par RhIA et RhIB soient couplés avec une deuxième molécule de dTDP-L-rhamnose afin de produire des di-rhamnolipides (Rahim *et al.*, 2001).

Les gènes codant pour les trois enzymes RhIA, RhIB et RhIC sont respectivement *rhIA*, *rhIB* et *rhIC* (Soberón-Chávez, 2010). Les gènes *rhIA* et *rhIB* sont organisés en opéron, alors que *rhIC* est retrouvé un peu plus loin dans le génome (**Fig. 1.3**). Le gène *rhIC* est également organisé en opéron avec le gène PA1131 (Rahim *et al.*, 2001), codant pour une protéine dont la fonction n'a pas été encore élucidée. Cependant il apparaît qu'elle ne joue aucun rôle dans la biosynthèse ou dans la sécrétion des rhamnolipides (Wittgens *et al.*, 2017).



Figure 1.3 : Organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* PAO1. (Adapté de <http://www.pseudomonas.com>)

1.2.4.2 Origine des précurseurs métaboliques

Les rhamnolipides sont constitués d'une ou plusieurs molécules de rhamnose relié(e)s par une liaison osidique à une moitié lipidique composée d'acide gras hydroxylés. Deux types de précurseurs métaboliques sont donc nécessaires pour la biosynthèse des rhamnolipides, à savoir le substrat lipidique pour l'enzyme RhIA d'une part, et le dTDP-L-rhamnose, constituant un des substrats des enzymes RhIB et RhIC d'autre part.

- La synthèse des β -hydroxyacyl-ACP (HA-ACP) ou *R*-3-hydroxyacyl-CoA (HA-CoA)

La fonction de l'enzyme RhIA n'a pas été pleinement élucidée et un doute persiste sur la nature de son substrat. Initialement décrite comme une sous unité de rhamnolsyltransférase (Ochsner *et al.*, 1994), son rôle a par la suite plutôt été attribué à la biosynthèse du précurseur lipidique des rhamnolipides plutôt qu'au transfert du rhamnose en tant que tel (Deziel *et al.*, 2003). Plusieurs modèles s'affrontent pour définir l'origine métabolique des précurseurs lipidiques impliqués dans la réaction enzymatique catalysée par RhIA. Deux études de l'activité de RhIA, réalisées *in vitro*, ne convergeaient déjà pas vers la même conclusion. En effet, l'activation des précurseurs *R*-3-hydroxyalcanoates était attribuée soit à une co-enzyme A (Burger *et al.*, 1962), soit à un ACP « acyl carrier protein » (K Zhu *et al.*, 2008). Depuis, des études réalisées *in vivo* indiquent que plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans la biosynthèse du substrat de RhIA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014, Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2019, Lin Zhang *et al.*, 2012).

L'un des modèles proposés repose sur le fait qu'une enzyme hypothétique de type β -cétolipid-ACP synthase permettrait de détourner le C8-CoA de la β -oxydation vers la voie de la biosynthèse *de novo* des acides gras ou FAS II pour donner des β -hydroxyacyl-ACP qui serviraient de substrats à RhIA (Lin Zhang *et al.*, 2012) (**Fig. 1.4**).

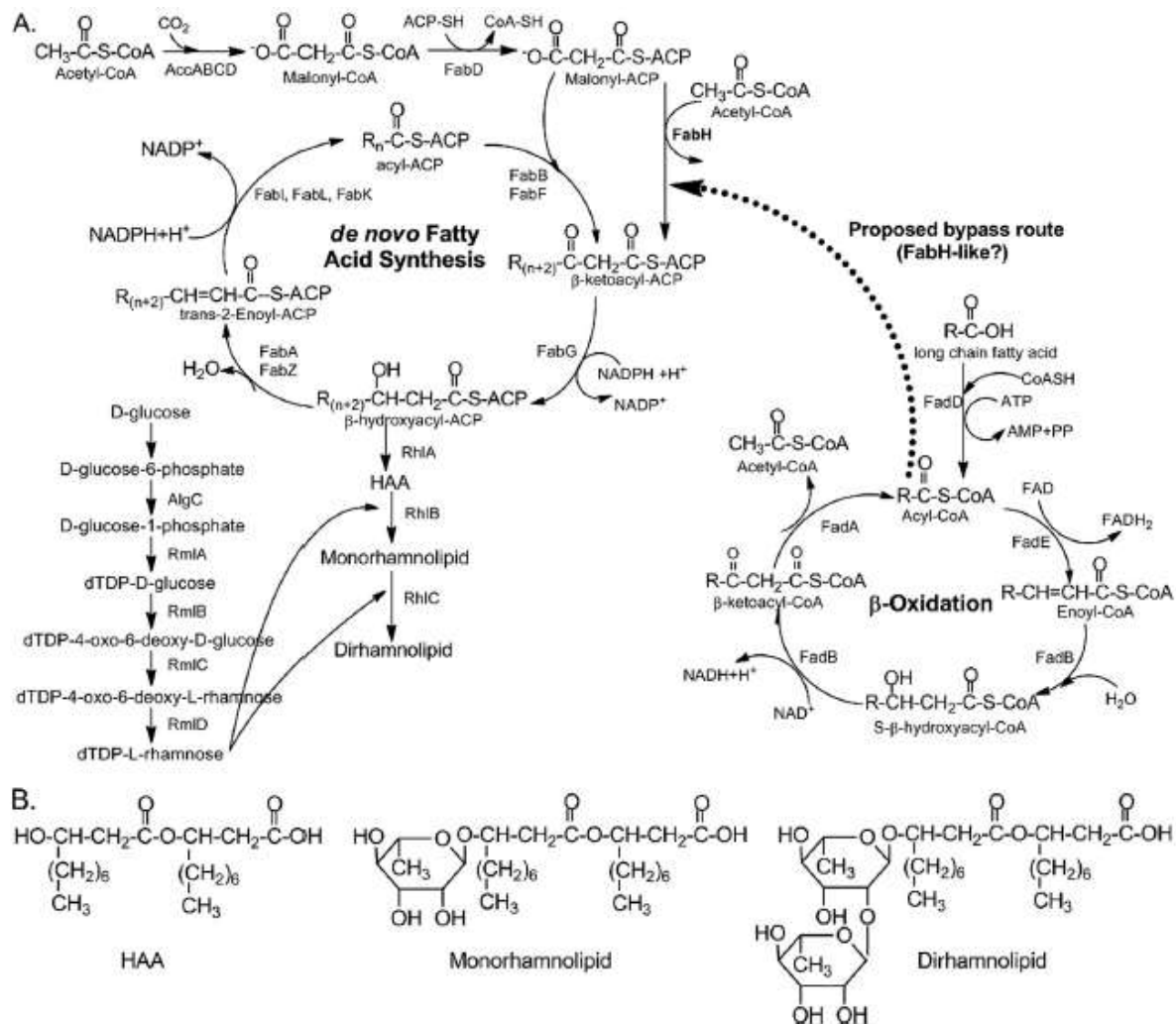


Figure 1.4 : Modèle proposé par (Lin Zhang *et al.*, 2012)

Une observation est à l'origine du débat sur l'origine des précurseurs lipidiques : une stéréo-isomérisation *R* a été observée au niveau des acides gras hydroxylés des HAA, suggérant tout d'abord que la FAS II pourrait fournir les précurseurs puisque celle-ci libère des molécules possédant cette stéréo-isomérisation. Cependant, une étude par marquage isotopique a démontré que la β -oxydation constituerait la source des acides gras hydroxylés pour la synthèse des rhamnolipides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). Dans ce modèle, le *trans*-2-énoyl-CoA issu de la β -oxydation serait hydraté par une énoyl-CoA hydratase spécifique pour la chiralité *R* (RhYZ) pour former un *R*-3-hydroxyacyl-CoA, qui agirait ensuite comme le précurseur lipidique pour la synthèse des HAA par RhIA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014) (Fig 1.5).

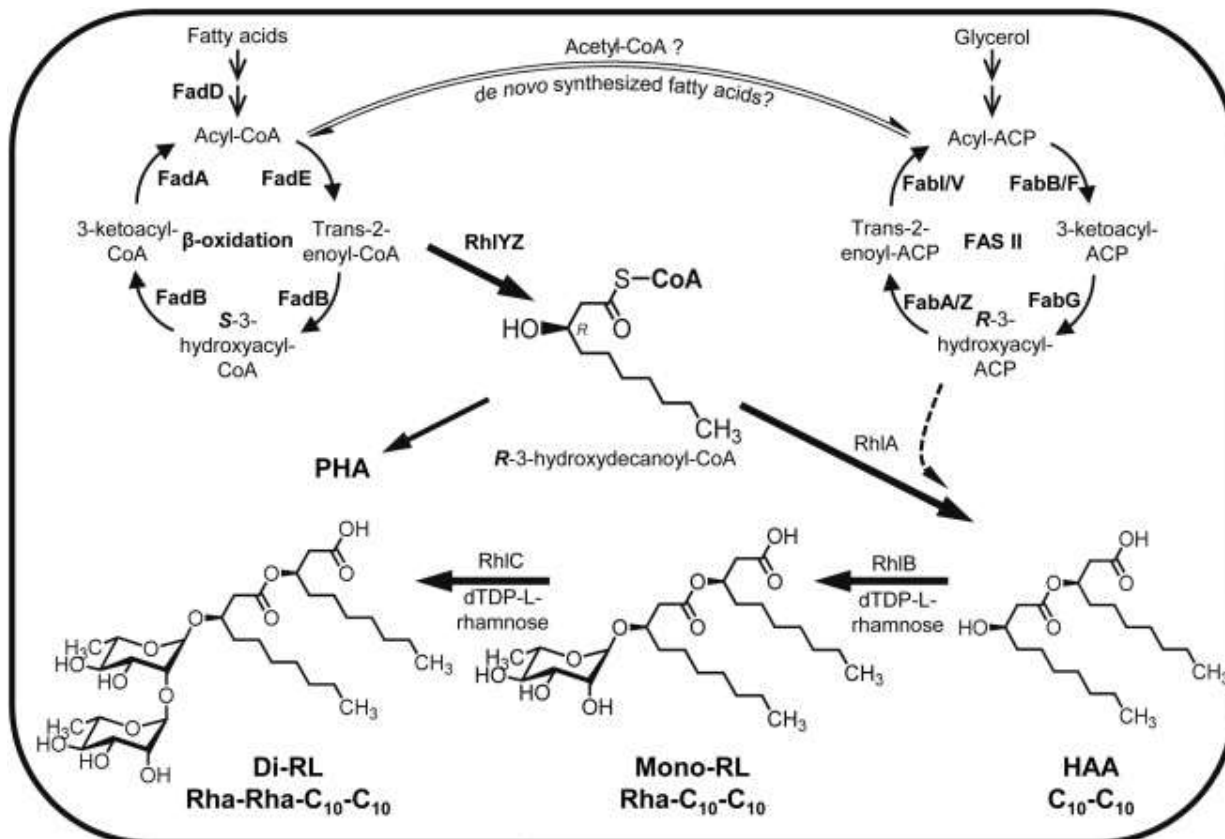


Figure 1.5 : Modèle proposé par (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014)

Ces deux modèles démontrent l'importance de la β -oxydation mais ne convergent pas vers les mêmes mécanismes menant à l'obtention du substrat de RhlA. En effet dans le premier modèle ce substrat serait le 3-hydroxyacyl-ACP tandis que dans le second le substrat serait le R-3-hydroxyalkanoyl-CoA.

Enfin, un troisième modèle, plus récemment publié suggère au contraire que la FAS II serait entièrement responsable de la synthèse des précurseurs lipidiques utilisés par RhlA. Une transacylase inconnue permettrait la conversion du trans-2-enoyl-ACP de la FAS II en trans-2-enoyl-CoA qui servirait ensuite de substrat aux enzymes RhlY et RhlZ (Fig 1.6) (Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2019). De plus, des travaux non publiés dans le laboratoire Déziel iraient dans le sens de ce modèle puisqu'il a été démontré que les acides gras produits *via* FAS II ne nécessitent pas d'être dirigés vers la β -oxydation pour devenir les précurseurs des HAA (Dulcey, 2019).

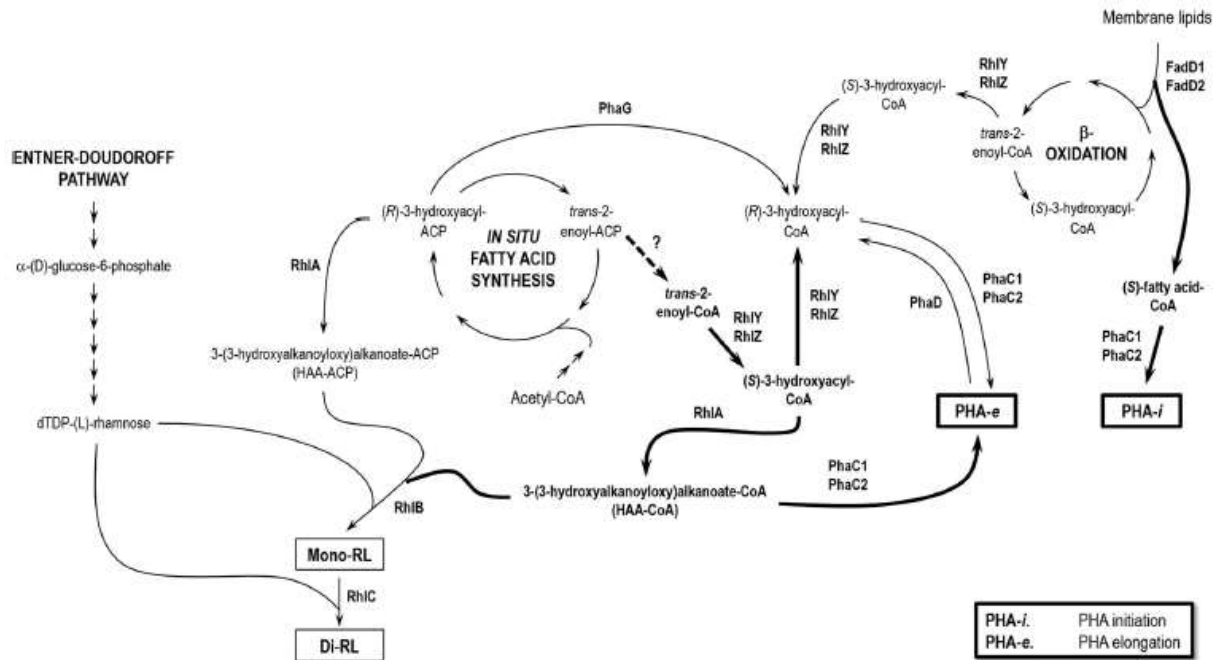


Figure 1.6 : Modèle proposé par (Gutiérrez-Gómez et al., 2019)

Les mécanismes d'obtention tout comme au final la nature du substrat de RhlA restent controversés et flous malgré les différentes études menées, la principale interrogation résidant dans l'activation du substrat en CoA ou en ACP.

➤ La synthèse du dTDP- L-rhamnose

La biosynthèse du L-rhamnose est réalisée par l'action de quatre enzymes codées par les gènes *rfbB*, *rfbD*, *rfbA* et *rfbC*, qui ont d'abord été décrits chez *Shigella dysenteriae* (Klena et al., 1993). Des homologues de ces gènes ont été retrouvés chez *P. aeruginosa*, et constituent l'opéron *rmlBDAC* (Rahim et al., 2000). Les protéines associées, RmlB, RmlA, RmlC et RmlD, catalysent les réactions menant à la synthèse du dTDP-L-rhamnose, permettant ainsi de fournir les substrats de RhlB et RhlC.

1.2.4.3 La régulation de la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* par le *quorum sensing*

Au niveau génétique, la biosynthèse des rhamnolipides est contrôlée par le *quorum sensing*, grâce une régulation fine des gènes impliqués. Le *quorum sensing* (QS), aussi appelé communication intercellulaire, est un principe qui repose sur l'activation ou la répression

coordonnée de gènes, qui dépendent à la fois de la densité bactérienne et de la concentration de molécules de signalisation que les bactéries diffusent (Melissa B Miller *et al.*, 2001).

Le quorum sensing a été caractérisé pour la première fois chez l'espèce *Vibrio fischeri* (Dunlap, 1999), chez qui un système *luxRI* a été identifié (Fuqua *et al.*, 1994). Chez les bactéries à Gram-négatif, la majorité des systèmes de *quorum sensing* fonctionnent globalement selon le même schéma et donc la même nomenclature est utilisée pour le système *luxRI*. Ainsi, une ou plusieurs molécules de signalisation spécifiques (ou auto-inducteurs = AI) sont produites par une synthase (I), et sont reconnues par un ou plusieurs récepteurs précis (R).

Les acyl homoserine lactone (AHL) sont les AI diffusibles généralement utilisés par les bactéries à Gram négatif. Ces AHL sont sécrétées individuellement par chaque bactérie à un niveau basal. Lorsque la densité cellulaire, et par conséquent la concentration en molécules de signalisation sécrétées, dépasse un certain seuil appelé *quorum*, les récepteurs spécifiques qui sont en fait des régulateurs transcriptionnels de type LuxR, sont activés et contrôlent alors l'activation ou la répression de nombreux gènes (Melissa B Miller *et al.*, 2001). Une boucle d'autorégulation est également créée puisqu'ils régulent la transcription de leurs propres gènes.

Ainsi, *P. aeruginosa* possède plusieurs systèmes de régulation basés sur la densité de cellules dans le milieu (Jasmine Lee *et al.*, 2015). En effet, la bactérie bénéficie d'au moins trois systèmes complexes de régulation du *quorum sensing* : le système *LasRI*, le système *RhlRI* et enfin un dernier système nommé « Pseudomonas Quinolone Signal » (PQS) (Diggle *et al.*, 2003, Jimenez *et al.*, 2012).

Une hiérarchie a été démontrée entre ces systèmes et un modèle détaillé a été proposé pour décrire les interactions qui existent entre eux (Dekimpe *et al.*, 2009). Le système *las* serait le premier exprimé et régulerait *rhl* et PQS. Si l'on regarde en détails, les systèmes de *quorum sensing las* et *rhl* sont bien caractérisés chez *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2009). En effet, le système *las* utilise l'AHL N-(3-oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL), qui est synthétisée par la synthase LasI, elle-même codée par le gène *lasI*. Ce signal 3-oxo-C₁₂-HSL va activer le régulateur transcriptionnel LasR, codé par le gène *lasR* et ainsi contrôler l'expression de différents gènes. Parmi ses cibles, on peut citer le gène *rhlR* codant le régulateur transcriptionnel RhlR ainsi que le gène *rhlI* codant la synthase RhlI.

Le système *rhl* dépend quant à lui de la N-butanoyl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) qui est synthétisée par RhlI et qui active RhlR. Ainsi, sous le contrôle de RhlR, l'expression des gènes

codant les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides, à savoir l'opéron *rhlAB* et le gène *rhlC*, va être régulée.

1.2.4.4 La régulation post-transcriptionnelle impliquée dans la production des rhamnolipides

Peu de mécanismes sont décrits concernant la régulation post-transcriptionnelle impliquée dans la production des rhamnolipides. Parmi eux, on peut citer le système RsmA/RsmZ (Heurlier *et al.*, 2004). En effet, RsmA contrôle positivement différentes fonctions contribuant à la colonisation chez *P. aeruginosa*, comme la motilité de type swarming ou la production de rhamnolipides et de lipases. RsmA serait négativement régulé par l'action de RsmZ, un petit ARN non codant, lui-même activé par le système à deux composantes GacA/GacS.

Plus récemment, une étude a mis en évidence NrsZ, qui est un petit ARN non-codant découvert chez *P. aeruginosa* PAO1 (Wenner *et al.*, 2014). De concert avec le facteur sigma RpoN, ce petit ARN serait induit par un système à deux composantes (NtrB/C), connu pour son implication dans la motilité de type *swarming* et l'assimilation de l'azote en conditions limitantes de cet élément. Ainsi, NrsZ favoriserait la motilité de la bactérie en contrôlant la production des rhamnolipides, impliquant un contrôle post-transcriptionnel de du gène *rhlA*.

1.2.5 Les facteurs impliqués dans la production de rhamnolipides

L'essentiel des études publiées portent sur la production de rhamnolipides issues de fermentations de *P. aeruginosa*. Cependant, les facteurs-clés de la réalisation d'une fermentation peuvent être appliqués à d'autres micro-organismes. En effet, dans toute stratégie de production par voie fermentaire, plusieurs facteurs sont à prendre en compte, à savoir les facteurs nutritionnels, les facteurs physico-chimiques et le procédé de fermentation en tant que tel. Plus précisément, le rendement et la composition en rhamnolipides dépend certes de la souche productrice mais aussi de la nature de la source de carbone, de la source d'azote, du ratio C : N, des limitations nutritionnelles, sans compter les conditions de cultures incluant la température, l'aération, l'agitation et le pH (Vanavil *et al.*, 2014).

1.2.5.1 Facteurs nutritionnels affectant la production de rhamnolipides

Les différents composés présents dans un milieu de culture peuvent affecter la production de rhamnolipides, comme la source de carbone, la source d'azote ou encore les minéraux, comme cela a été rapporté pour *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Cependant, rien n'indique si ces mêmes facteurs nutritionnels joueront un rôle dans la biosynthèse des rhamnolipides pour d'autres souches produisant ce métabolite, par exemple chez *B. thailandensis*.

- **Les sources de carbone**

Les sources de carbone solubles ou insolubles ont été documentées pour la production de rhamnolipides. Les plus décrites sont le glucose, le fructose, le sucrose, l'octanoate, le mannitol, le glycérol, l'huile canola, l'huile de tournesol, l'huile d'olive... Notons que les huiles végétales sont particulièrement efficaces pour promouvoir la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Les procédés de production décrits dans la littérature utilisent principalement : des huiles végétales (Giani *et al.*, 1996), des glucides (Kyung Mi Lee *et al.*, 2004), du glycérol (Shan-Yu Chen *et al.*, 2007), des hydrocarbures (Deziel *et al.*, 1996).

- **Les sources d'azote, minéraux et fer**

Beaucoup de sources d'azote ont été étudiées et décrites dans la littérature concernant la production de rhamnolipides. Cependant, les nitrates semblent être parmi les meilleures sources d'azotes pour l'induction de la production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (Deziel *et al.*, 2003), contrairement à l'ammonium (Arino *et al.*, 1996).

De façon intéressante, la limitation en azote, en phosphore ou en ion multivalent en combinaison avec un excès de source carbonée est employée dans la mise en place de procédés de production. De même, ce ne sont pas seulement la nature des sources de carbone et d'azote utilisés qui jouent un rôle important dans la productivité de rhamnolipides, ce sont aussi les ratios entre ces deux entités chimiques au sein du milieu de culture (Luis Guerra-Santos *et al.*, 1984a, Mulligan *et al.*, 1989, Reiling *et al.*, 1986, Wu *et al.*, 2008).

Enfin, en dehors des limitations en phosphore ou en azote, la disponibilité réduite d'ions comme Mg, Ca, K ou Na, ou encore en éléments trace permet souvent d'obtenir de meilleurs rendements de production de rhamnolipides (Luis H Guerra-Santos *et al.*, 1986, Nitschke *et al.*, 2005).

1.2.5.2 Facteurs physico-chimiques affectant la production de rhamnolipides

La production des biosurfactants peut être influencée par les conditions de culture telles que la température, le pH, et l'agitation.

- **Le pH**

Chez *P. aeruginosa*, plusieurs études ont démontré l'importance du pH, et ce à plusieurs niveaux : le pH aurait un effet non seulement sur le rendement de production en rhamnolipides, mais pourrait orienter également les pourcentages des différents congénères produits.

En effet, le rôle du pH chez *P. aeruginosa* O-2-2 a été mis en évidence en comparant une fermentation batch en bioréacteur 5L et une fermentation batch en bioréacteur 5L dont le pH était contrôlé (Lingqing Zhu *et al.*, 2012). La première a donné un rendement de production de rhamnolipides de 24,06 g/L contre 28,8 g/L pour la seconde, soit une augmentation d'environ 20%. De plus, dans cette étude, la majorité du substrat a été converti en rhamnolipides et non en biomasse, ce qui laisse penser que ces rendements peuvent être améliorés si la densité cellulaire augmente. Dans cette optique, une fermentation en mode *fed-batch* a été réalisée en condition de pH contrôlée, entraînant un rendement de production de rhamnolipides atteignant 70,56 g/L quand la vitesse d'agitation est maintenue à 500 rpm, la température à 30°C et le pH à 7-7,5 pendant les premières 24h du procédé puis à 6-6,5 pendant le reste de la fermentation (qui a duré jusqu'à 120h) (Lingqing Zhu *et al.*, 2012). Le pH jouerait donc un rôle important dans la production des rhamnolipides, suggérant une sensibilité des enzymes responsables de la biosynthèse à ce paramètre de fermentation.

D'autre part, une autre étude montre l'implication du pH dans la répartition des congénères produits par *P. aeruginosa* PAO1 (dos Santos *et al.*, 2015). Le pourcentage de mono-rhamnolipides et de di-rhamnolipides varie en fonction du pH du milieu de culture. Il a été noté que la fraction de mono-rhamnolipides est moins importante que celle de di-rhamnolipides en condition de pH inférieure à 7. Au contraire, pour des valeurs de pH supérieures à 7, les proportions entre les deux types de congénères sont semblables. Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène est que le pH affecte au niveau transcriptionnel la synthèse des

rhamnosyltransférases, la synthèse d'un transporteur de glycolipide spécifique ou la synthèse de L-rhamnose chez *P.aeruginosa* (Olvera et al., 1999).

- **Température de culture**

Peu d'études ont été menées sur l'effet de la température sur la production de rhamnolipides. Malgré tout, il ressort que chez *P. aeruginosa*, une gamme de température a été explorée, allant de 25°C à 47°C degrés. La production de rhamnolipides est plus importante sur des cultures dont la température est comprise entre 25°C et 37°C. Les meilleurs rendements de production obtenus le sont en culture maintenue à 37°C (Moussai et al, 2014; Eraqi et al, 2015).

- **Aération et agitation**

L'agitation et l'aération sont deux paramètres de culture étroitement liés puisqu'ils sont deux composantes du KLa. Par définition le KLa correspond au coefficient volumétrique de transfert d'oxygène, qui peut se décomposer en KL (la conductance globale définie par rapport à la phase liquide), et en a (l'aire de contact gaz/liquide) (Garcia-Ochoa *et al.*, 2009). Le transfert d'oxygène est d'importance majeure pour l'oxydation des substrats lors de fermentation aérobie.

Plusieurs modèles s'affrontent pour caractériser le KLa. En effet, on peut citer le modèle d'eddy, dans lequel le transfert interfacial est indépendant du diamètre des bulles, et le modèle de vitesse de glissement, où le transfert est dépendant du diamètre des bulles. Linek *et al.* estiment que seul le modèle d'eddy est valable, même en présence de surfactant et d'agent viscosant (Linek *et al.*, 2004, Linek *et al.*, 2005). De ce fait, l'agitation joue également un rôle important dans la mesure où l'augmentation de l'agitation va permettre d'augmenter la turbulence (Lamont *et al.*, 1970) et donc le nombre de bulles et la surface d'échange, permettant un transfert d'oxygène.

Dans le cas de la production de rhamnolipides, des études ont montré qu'un bon transfert d'oxygène favorise de meilleurs rendements. En fait, c'est l'augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à 200 rpm, et donc la turbulence plus élevée qui serait responsable de la meilleure production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. Ainsi, plus le niveau de l'aération est haut, plus la production de rhamnolipides est importante (Vanavil *et al.*, 2014).

Cependant, la contrainte majeure rencontrée dans les procédés de production de rhamnolipides sous des conditions aérobie est la formation excessive de mousse, liée justement à l'aération et à l'agitation du milieu dans le bioréacteur. De façon conventionnelle, des agents antimousse d'origine chimiques sont utilisés, comme par exemple huile de silicone, mais peuvent

affecter la croissance bactérienne, la synthèse des produits, ou diminuer l'efficacité des procédés de purification. Plusieurs alternatives existent, à savoir un contrôle mécanique, une collecte de la mousse, ou encore un remplissage partiel de la cuve de fermentation (Markus Müller *et al.*, 2010, Trummler *et al.*, 2003, Walter *et al.*, 2010).

1.3 La production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*

1.3.1 *Burkholderia thailandensis*

B. thailandensis est une bactérie retrouvée dans les sols de l'Asie du Sud-Est et au nord de l'Australie. *B. thailandensis* appartient au groupe des *bptm* (Charlotte D Majerczyk *et al.*, 2013), qui rassemble, au sein du genre *Burkholderia*, trois souches génétiquement très proches, à savoir *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* et *B. mallei*. Ces trois souches sont génétiquement très proches, même si leurs modes de vie diffèrent. En effet, *B. pseudomallei* et *B. mallei* sont des pathogènes pouvant affecter l'humain, alors que *B. thailandensis* est un saprophyte non pathogène. Ainsi, de par son caractère non pathogène, *B. thailandensis* représente un modèle pour l'étude de *B. pseudomallei* et *B. mallei*.

Ce groupe présente ainsi un haut degré de similarités biochimiques, physiologiques et génétiques, particulièrement au niveau des systèmes de *quorum sensing* (Ulrich *et al.*, 2004a, Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c). Même si l'organisation génétique de ces systèmes est très conservée chez ces trois bactéries, il apparaît que leurs mécanismes de fonctionnement divergent, au niveau, entre autres exemples, des boucles d'auto-régulation des systèmes Btal3/BtaR3, Bpsl3/BpsR3 et Bmal3/BmaR3 (Le Guillouzer, 2018).

Les membres du *bptm* comptent deux chromosomes. Le chromosome I code des fonctions principales associées au métabolisme central ainsi qu'à la croissance cellulaire (Holden *et al.*, 2004, Nierman *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2006) comme par exemple, la biosynthèse des macromolécules, le métabolisme des acides aminés, la chimiotaxie ou encore la mobilité. En revanche, le chromosome II serait impliqué dans des fonctions secondaires associées à l'adaptation et à la survie aux différentes niches écologiques. Citons, par exemple, la protection osmotique, l'acquisition du fer, la régulation ou encore le métabolisme secondaire.

B. thailandensis est capable de produire un grand nombre de métabolites secondaires (Mao *et al.*, 2017), incluant les rhamnolipides (Dubeau *et al.*, 2009) et les polyhydroxyalcanoates (Funston *et al.*, 2017).

1.3.2 Organisation génétique

Comme mentionné précédemment, la biosynthèse des rhamnolipides est sous le contrôle de trois gènes : *rhIA*, *rhIB* et *rhIC*, initialement identifiés chez *P. aeruginosa*. De façon intéressante, il a été rapporté que *B. thailandensis* portait non pas une mais deux copies de ces gènes, organisés en deux opérons distincts et tout deux portés sur le deuxième chromosome (Dubeau *et al.*, 2009) (**Fig.1.7**). De plus, contrairement à *P. aeruginosa*, chez qui seuls les gènes *rhIA* et *rhIB* sont regroupés, les trois gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC* appartiennent à un même opéron chez *B. thailandensis*. La même observation a été faite chez *B. pseudomallei* (Dubeau *et al.*, 2009).

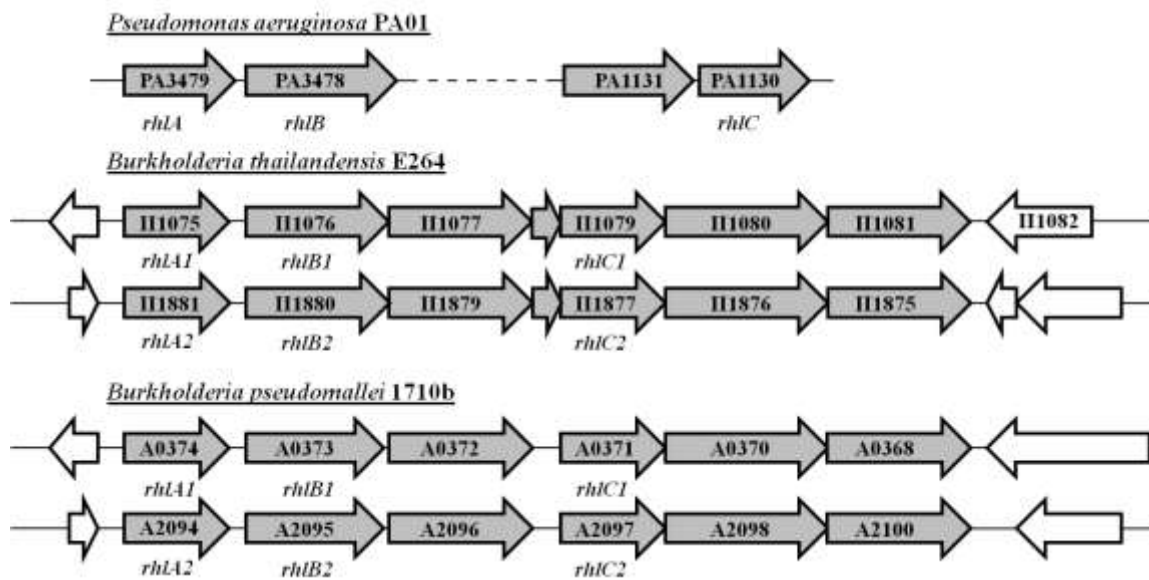


Figure 1.7 : Représentation schématique de l'organisation des gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC* de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *B. thailandensis* E264 et *B. pseudomallei* 1710b

(Figure tirée de Dubeau *et al.* 2009). On voit les gènes *rhIA* et *rhIB* ainsi que les deux groupes de gènes identiques contenant les homologues aux gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC* chez *B. thailandensis* E264 et *B. pseudomallei* 1710b.

Les deux opérons permettant la biosynthèse des rhamnolipides chez *B. thailandensis* sont fonctionnels mais contribuent dans des concentrations différentes à la production du métabolite (Dubeau *et al.*, 2009, Humery, 2013) (**Fig. 1.8**).

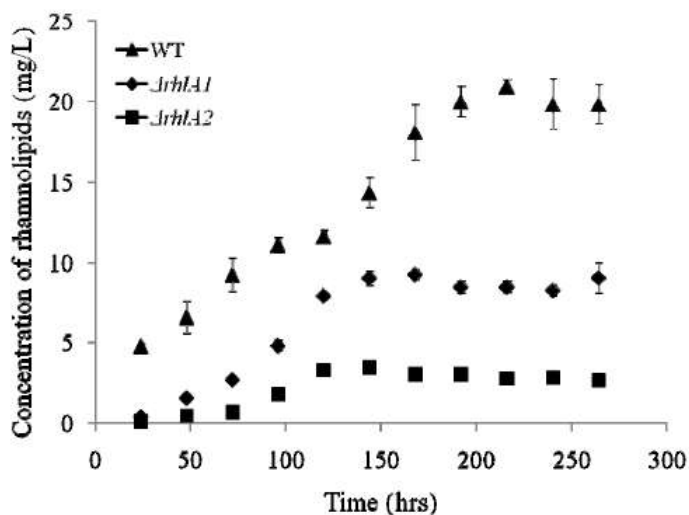


Figure 1.8 : La production de rhamnolipides par les simples mutants *rhIA1* et *rhIA2* chez *B. thailandensis*.

Figure tirée de (Dubeau *et al.*, 2009) La souche sauvage E264 ainsi que les simples mutants *rhIA1* ou *rhIA2* ont été cultivés en milieu NB+2%glycérol et la production des rhamnolipides C14-C14 a été quantifiée par LC-MS.

Plusieurs autres gènes ont été documentés dans la littérature comme jouant un rôle indirect dans la production des rhamnolipides. Ces gènes, identifiés chez *P. aeruginosa* et nommés *rhIY* et *rhIZ*, sont responsables de l'isomérisation du 2-decenoyl-CoA, un intermédiaire de la β -oxydation, en *R*-3-hydroxydecanoyl-CoA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). Ainsi, d'autres recherches d'homologies non publiées ont mis en évidence les gènes BTH_II1799 et BTH_II1798 qui présentent 74% et 77% d'identité avec les gènes *rhIY* (PA14_54640) et *rhIZ* (PA14_54660)

1.3.3 Origine des précurseurs : voie métaboliques impliquées

Chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse des rhamnolipides repose sur la disponibilité des précurseurs nommés HAA décrits précédemment. Comme expliqué à la **Section 1.2.4.2**, parmi les modèles proposés, les HAA sont obtenus par l'action de l'enzyme RhIA qui catalyse la réaction de dimérisation d'un substrat provenant soit de la voie de la β -oxydation des acides gras soit de la FAS II (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014, Dulcey, 2019, Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2019, Lin Zhang *et al.*, 2012). Une étude récente a permis d'identifier la voie métabolique permettant de fournir les substrats nécessaires à la réaction enzymatique réalisée par RhIA chez *B. thailandensis* (Irorere *et al.*, 2018). En effet, des cultures réalisées en présence d'acide stéarique marqué ainsi qu'avec du glycérol ont permis d'identifier la voie de la synthèse *de novo* des acides gras comme principal

fournisseur de précurseurs pour la biosynthèse des rhamnolipides (Irorere *et al.*, 2018). Ces observations témoignent que les voies métaboliques impliquées dans la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis* sont différentes de celles chez *P. aeruginosa*, chez qui la voie de la β -oxydation semble être à l'origine des précurseurs de l'enzyme RhIA.

1.3.4 La régulation de la production des rhamnolipides par le *quorum sensing*

Plusieurs systèmes de QS ont été répertoriés chez *B. thailandensis*. Les recherches d'homologies réalisées au sein du genre *Burkholderia* montrent que les gènes du *quorum sensing* sont très conservés. Concernant *B. thailandensis*, trois systèmes complets de type *luxRI* ont été identifiés : *btaRI1*, *btaRI2* et *btaRI3*. En plus de ces trois systèmes, *B. thailandensis* possède deux régulateurs de type LuxR orphelins identifiés comme BtaR4 et BtaR5 (Ulrich *et al.*, 2004c).

1.3.4.1 Les systèmes BtaI/BtaR chez *B. thailandensis*

Trois systèmes de QS ont été recensés chez *B. thailandensis*, il s'agit des systèmes BtaI1/R1, BtaI2/R2 et BtaI3/R3, aussi nommés QS1, QS2 et QS3, respectivement. Les synthases de type LuxI sont codées par les gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* alors que les régulateurs de type LuxR sont codés par les gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*, respectivement (Ulrich *et al.*, 2004c).

Les bactéries appartenant au groupe *Bptm*, comme *B. thailandensis*, utilisent des auto-inducteurs (AI) appartenant à la famille des *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) au sein de leurs systèmes de QS. Plus spécifiquement, les AHL principalement produites chez *B. thailandensis* sont la *N*-(octanoyl)-L-homosérine lactone (C₈-HSL), la *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₈-HSL) et la *N*-(3-hydroxy-décanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₁₀-HSL). Cependant, ces trois AHL ne sont pas produites dans les mêmes proportions. En effet, les deux AHL majoritairement retrouvées sont la C₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL alors que la 3OHC₈-HSL est moins abondante (Chandler *et al.*, 2009, C Majerczyk *et al.*, 2014a). La 3OHC₁₀-HSL reste l'AHL principalement produite (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017)

Plusieurs études ont permis de démontrer que la C₈-HSL est le principal AI du système BtaI1/R1 et que sa synthèse est catalysée par BtaI1 (Chandler *et al.*, 2009, Ulrich *et al.*, 2004c). De plus, l'association de la C₈-HSL avec le régulateur BtaR1 permettrait une activation spécifique au niveau d'une boîte *lux* située dans la région promotrice de *btaI1* de façon à stimuler l'expression de ce gène (Le Guillouzer *et al.*, 2017, C Majerczyk *et al.*, 2014a). Le QS1 est impliqué dans divers phénomènes tels que l'auto-agrégation bactérienne, le développement du

biofilm, la production d'exopolysaccharides, l'inhibition de croissance contact-dépendant et la biosynthèse de l'acide oxalique (Chandler *et al.*, 2009, Goo *et al.*, 2012, C Majerczyk *et al.*, 2014a, C Majerczyk *et al.*, 2016, Tseng *et al.*, 2016, Ulrich *et al.*, 2004c).

En ce qui concerne le système de QS2, la synthase BtaI2 est responsable de la synthèse de la 3OHC10-HSL (Duerkop *et al.*, 2009). De plus l'étude des cultures d'un double mutant des synthases *btaI1* et *btaI3* a révélé la présence de 3OHC8-HSL, suggérant que le système de QS2 jouerait également un rôle dans la production de cette AHL (Duerkop *et al.*, 2009). En revanche, la synthase BtaI2 n'interviendrait pas dans la biosynthèse de la C₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009). Similairement au système de QS1, le système de QS2 serait finement régulé par une boucle d'auto-régulation (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, C Majerczyk *et al.*, 2014a). En effet, plusieurs études montrent que BtaR2, en association avec la 3OHC8-HSL et la 3OHC10-HSL, pourrait activer l'expression du gène *btaI2* (Duerkop *et al.*, 2009). De plus, la transcription du gène *btaR2* est stimulée par la 3OHC8-HSL chez *B. thailandensis* E264, comme le démontrent les données de RNA-Seq fournies par (C Majerczyk *et al.*, 2014a). De façon intéressante, les gènes codant le système de QS2 se trouvent dans un contexte génomique particulier puisque les gènes avoisinants, nommés *bta*, codent tous des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'antibiotiques de la famille des bactobolines, suggérant un rôle du QS2 dans la production de ces antibiotiques (Duerkop *et al.*, 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2010). En effet, l'analyse transcriptomique publiée par (C Majerczyk *et al.*, 2014a) révèle que système BtaI2/BtaR2 contrôle positivement la transcription des gènes *bta*.

Le système de QS3 est composé de la synthase BtaI3 et du régulateur transcriptionnel BtaR3 (Ulrich *et al.*, 2004c). Le principal auto-inducteur de ce système est la 3OHC8-HSL, tel que démontré par des analyses en spectrométrie de masse réalisées par Chandler *et al.* (2009). Contrairement aux deux autres systèmes de QS retrouvés chez *B. thailandensis*, il n'y aurait pas dans le QS3 de boucle d'auto-régulation. En effet, les données publiées par (C Majerczyk *et al.*, 2014a) indiquent que le gène *btaI3* ne constitue pas une cible du régulateur transcriptionnel BtaR3 de *B. thailandensis* E264. Cependant, dans une étude plus récente, une sous-expression du gène *btaI3* dans le mutant *btaR3* a été observée, suggérant que *BtaR3* active *btaI3* (Le Guillouzer *et al.*, 2017). De plus, aucune fonction spécifique n'a été à ce jour reportée pour le QS3 même si des résultats préliminaires suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle dans l'activité lipolytique, la morphologie coloniale ou encore la production d'hémolysines (Ulrich *et al.*, 2004c).

L'existence de potentielles interactions entre les différents systèmes QS1, QS2 et QS3 pourrait raisonnablement justifier les difficultés rencontrées en ce qui concerne l'identification de

fonctions biologiques spécifiques à ces systèmes de régulation. Les C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL sont séquentiellement produites pendant la croissance bactérienne et ces productions sont corrélées aux profils d'expression de *bta11*, *bta12* et *bta13*, indiquant une activation successive des systèmes de QS correspondants. De plus, les trois systèmes de QS sont interdépendants et coopèrent de façon dynamique pour moduler l'expression des gènes ciblés par le QS (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Enfin, le QS joue un rôle important dans la régulation de l'expression d'une large gamme de gènes codant des enzymes nécessaires à la production des nombreux métabolites secondaires (C Majerczyk *et al.*, 2014a).

1.3.4.2 Le système *hmqABCDEFG* chez *B. thailandensis*

Bien que la modulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire soit principalement attribuée à des systèmes de communication intercellulaire utilisant des AHL comme signaux moléculaires, un autre système de QS hypothétique, appelé *hmq* et homologue au système *pqs* de *P. aeruginosa*, a été identifié chez *B. thailandensis* (Vial *et al.*, 2008).

Ce système fait appel à des molécules de signalisation putatives qui appartiennent à la famille des HAQ, et plus précisément HAQ méthylées : les 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), dont la biosynthèse implique principalement des enzymes codées par les gènes *hmqABCDEFG*. Ce système est génétiquement proche du système *pqsABCDE* retrouvé chez *P. aeruginosa*, puisque *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD* et *hmqE*, sont respectivement homologues aux gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* et *pqsE* de *P. aeruginosa* (Diggle *et al.*, 2006a, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2008), avec vraisemblablement des fonctions similaires, résultant en la formation des HAQ. Deux autres gènes complètent l'opéron chez *B. thailandensis*, à savoir les gènes *hmqF* et *hmqG*, mais qui ne possèdent pas d'homologues chez *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008). Ces deux gènes codent les protéines HmqF et HmqG, qui sont responsables de l'insaturation, s'il y a lieu, et de la méthylation des HMAQ, respectivement (Agarwal *et al.*, 2012, Vial *et al.*, 2008).

Le système *pqsABCDE* est sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel de type LysR, nommé MvfR. Cependant, aucun homologue de *mvfR* aux alentours de l'opéron *hmqABCDEFG* ni de boîte LysR dans la région promotrice de cet opéron n'ont été retrouvés (Vial *et al.*, 2008), indiquant possiblement une régulation différente de celle de l'opéron *pqsABCDE* malgré leur homologie. Cependant, un régulateur de type LysR a été précédemment découvert dans le laboratoire Déziel, alors nommé HmqR, comme essentiel pour la transcription de l'opéron *hmq* et la production des HMAQ (Dumais, 2010), mais jamais publié. Récemment, ce régulateur a été

rapporté pour son action régulatrice sur plusieurs métabolites secondaires, par exemple en modulant l'opéron *hmqABCDEFG*. Nommé *scmR* pour « secondary metabolite regulator », ce régulateur jouerait également un rôle de répresseur sur de nombreux métabolites secondaires produits par *B. thailandensis* (Mao *et al.*, 2017).

Enfin, Mao *et al* (2017) ont démontré que la biosynthèse des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis*, à savoir la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL, est activée par ScmR, suggérant que l'expression et /ou la biosynthèse des métabolites secondaires est sous le contrôle des systèmes Bta1/BtaR1, Bta2/BtaR2 et Bta3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 via le régulateur transcriptionnel ScmR.

1.3.4.3 L'implication du *quorum sensing* dans la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*

La production des rhamnolipides chez *B. thailandensis* n'a été documentée que très récemment comme étant reliée au QS (Irorere U *et al.*, 2019), même si des études préliminaires et non publiées au sein du laboratoire Déziel suggéraient déjà un rôle de la communication intercellulaire dans la production des rhamnolipides (Humery, 2013). En effet, ces travaux préliminaires indiquaient que le QS joue un rôle dans la production des rhamnolipides puisque celle-ci est positivement affectée lorsque les trois gènes impliqués dans la synthèse des autoinducteurs principaux retrouvés chez *B. thailandensis* sont inactivés (**Fig 1.9**).

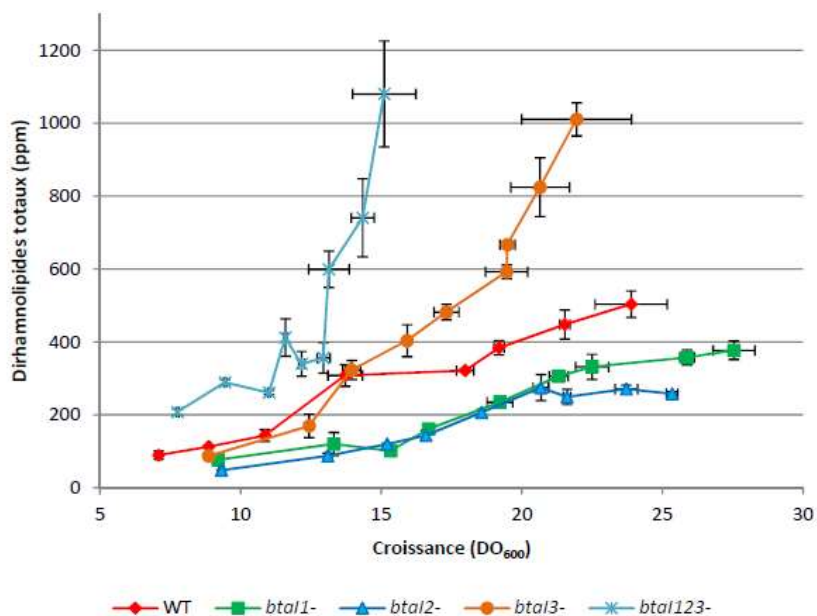


Figure 1.9 : Le QS affecte la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*

Figure tirée de (Humery, 2013) La souche sauvage E264 ainsi que les simples mutants *bta11-*, *bta12-*, *bta13-* ainsi que le triple mutant *bta11bta12bta13-* ont été cultivés en milieu NB+2%glycérol et la production des rhamnolipides a été quantifiée par LC-MS.

Une très récente étude a confirmé que les gènes codant pour les systèmes de *quorum sensing* de *B. thailandensis* pourraient représenter des cibles pour l'augmentation de la production des rhamnolipides chez cette bactérie (Irorere U *et al.*, 2019). En effet, l'étude du triple mutant $\Delta bta11\Delta bta12\Delta bta13$ a révélé que la production de rhamnolipides est deux à trois fois plus importante dans une souche où le QS est non fonctionnel par rapport à la souche sauvage, suggérant que le QS réprimerait la production des rhamnolipides.

Les gènes de synthèse *rhl* avaient cependant déjà été identifiés dans une étude du régulon contrôlé par le QS (C Majerczyk *et al.*, 2014a). La régulation des rhamnolipides serait au contraire favorisée par le *quorum sensing* chez d'autres bactéries du genre *Burkholderia*, comme par exemple pour *B. glumae* (Nickzad *et al.*, 2015). Le *quorum sensing* chez cette bactérie est beaucoup moins complexe que chez *B. thailandensis*. En effet, un seul système de type LuxR/I semble être impliqué dans la biosynthèse des rhamnolipides, il s'agit du système TofR/TofI (Kim *et al.*, 2004).

De même, le régulateur ScmR a aussi fait l'objet de travaux non publiés au sein du laboratoire Déziel (Humery, 2013), révélant également son implication dans la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Ce régulateur a été publié comme jouant un rôle sur la modulation de nombreux métabolites secondaires, cependant cette étude n'a pas fait mention des rhamnolipides (Mao *et al.*, 2017). Il a été établi dans cette même étude que l'expression de *scmR* était sous le contrôle du QS. Les travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont montré qu'une souche où le gène *scmR* est inactivé permet de produire jusqu'à 4 fois plus de rhamnolipides dans les conditions considérées (**Fig1.10**).

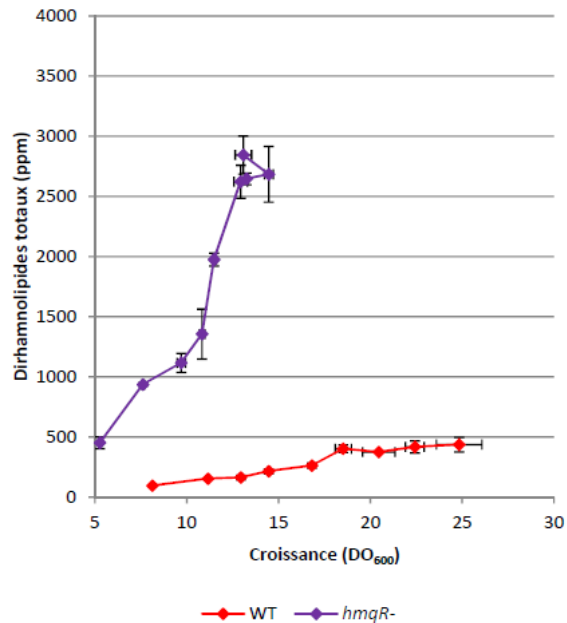


Figure 1.10 : ScmR réprime la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

Figure tirée de (Humery, 2013) La souche sauvage E264 ainsi que le simple mutant *scmR*-, alors nommé *hmqR*-, ont été cultivés en milieu NB+2%glycérol et la production des rhamnolipides a été quantifiée par LC-MS.

De façon intéressante, il semblerait que la production de rhamnolipides soit meilleure chez le mutant *scmR* que dans les mutants du *quorum sensing*, suggérant que l'expression de *scmR* serait contrôlée par d'autres mécanismes que le *quorum sensing*.

1.4 Applications industrielles et marché des rhamnolipides

1.4.1 Intérêts biotechnologiques et applications

Les rhamnolipides, de par leurs propriétés amphiphiles, présentent un éventail d'applications industrielles, tant au niveau environnemental, cosmétique, pharmaceutique qu'alimentaire. Quelques exemples sont décrits ici.

1.4.1.1 Applications à visées environnementales

Le fait que les rhamnolipides permettent la solubilisation de substrats hydrophobes ouvre la voie pour plusieurs utilisations. L'une d'elles serait la biorémédiation des milieux contaminés par ce genre de produits, en particulier les huiles ou hydrocarbures, que ce soit en cas de déversement sur sol ou dans l'eau (Lang *et al.*, 1999, Maier *et al.*, 2000, Pacwa-Płociniczak *et*

al., 2011). D'autre part, les rhamnolipides sont utilisés par les industries pétrolières afin d'améliorer les procédés d'extractions de pétrole brut mais aussi en diminuant la viscosité du pétrole pour faciliter son transport (De Almeida *et al.*, 2016). De plus, les rhamnolipides sont aussi capables de capter certains métaux tels que le cadmium, le plomb ou encore le zinc, et ont déjà été utilisés à des fins de décontamination (Gautam *et al.*, 2006). Enfin, au niveau de l'agriculture, les rhamnolipides peuvent être utilisés comme agent mouillant dans des biopesticides ou en tant qu'agent antimicrobien pour le contrôle biologique de phytopathogènes (Sachdev *et al.*, 2013).

1.4.1.2 Applications alimentaires

Les biosurfactants peuvent trouver un certain nombre d'applications dans le domaine alimentaire, notamment en tant qu'agent de préservation ou encore comme agent émulsifiant ou texturant (Irfan-Maqsood *et al.*, 2014, Nitschke *et al.*, 2007).

1.4.1.3 Applications en santé

Que ce soit dans les domaines cosmétiques ou pharmaceutiques les rhamnolipides sont utilisés du fait de leur meilleure compatibilité avec la peau et de leur potentiel d'irritation de la peau plus bas que les surfactants d'origine synthétique (Haba *et al.*, 2003). Ainsi on peut les retrouver dans des crèmes en tant qu'agent émulsifiant mais aussi pour différents soins de la peau (Lourith *et al.*, 2009, Maier *et al.*, 2000).

Les rhamnolipides sont aussi utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes, antivirales et antifongiques (Abalos *et al.*, 2001, Haba *et al.*, 2003, Rodrigues *et al.*, 2006). Par exemple, les rhamnolipides s'intercaleraient dans les membranes cellulaires, augmentant ainsi leur perméabilité et mèneraient donc à la mort cellulaire par ce mécanisme antimicrobien (Sotirova *et al.*, 2008). De plus, les rhamnolipides favoriseraient également la guérison des plaies telles que les brûlures (Stipcevic *et al.*, 2006) et seraient utilisés dans le traitement des ulcères ou du psoriasis (Piljac *et al.*, 2008).

Enfin, les rhamnolipides peuvent servir à la fabrication de nanoparticules qui pourraient être utilisées pour délivrer des médicaments (Dahrazma *et al.*, 2008, Kiran *et al.*, 2016, Felix Müller *et al.*, 2017).

1.4.1.4 Applications ménagères

Grâce à leurs propriétés amphiphiles, les rhamnolipides sont utilisés comme détergent ménager, présentant l'avantage d'être biodégradables et plus propres pour l'environnement que leurs homologues synthétiques (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014).

1.4.2 Marché des rhamnolipides

En 2012, la consommation mondiale de surfactants d'origine chimique a été estimée à 13 millions de tonnes (Marchant *et al.*, 2014) et ce chiffre devrait augmenter à 20 millions de tonnes en 2020 (Gudiña *et al.*, 2016). En 2013, les biosurfactants commercialisés représentaient seulement 350 000 tonnes (Tiso *et al.*, 2017) et devraient atteindre 462 000 tonnes en 2020 (<https://www.radiantinsights.com>). Cependant ces biosurfactants incluent une grande part de surfactants synthétisés artificiellement comme les methyl ester cétones et les alkyl polyglucosides. Ainsi, les biosurfactants d'origine microbienne représentent moins de 2% du marché, démontrant l'importance de l'optimisation de leur production.

Cinq compagnies se partagent le marché des biosurfactants puisqu'elles couvrent à elles-seules environs 90% de la demande globale. Ces leaders du marché des biosurfactants sont BASF Cognis, Ecover, Urumqui Unite, Saraya and MG Intobio (<https://www.radiantinsights.com>).

La part de marché des rhamnolipides est moindre mais pourrait tout de même se traduire par des ventes à hauteur de 2,8 milliards de dollars d'ici 2023 (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014).

Le coût de production des biosurfactants étant plus élevé que leurs homologues synthétiques, leur part de marché est plus restreinte. En effet, le coût moyen de production d'un biosurfactant est de 5-20 \$/kg contre 1-3\$/kg pour un surfactant d'origine synthétique. Plus précisément, plus le niveau de pureté souhaité est grand, plus le coût sera élevé. Par exemple, 100g de rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* et purs à 90% se vendent à partir de 319\$ (<https://www.sigmaaldrich.com>).

Différents facteurs entrent en jeu pour expliquer le coût élevé associé à la production industrielle des rhamnolipides. Parmi eux on citera principalement les coûts liés aux matières premières et aux procédés de purifications qui représentent à eux seuls 70 à 80% des coûts dans le cas des rhamnolipides (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014). Ainsi, un des axes d'optimisation de la production des rhamnolipides est de développer des procédés basés sur l'utilisation de substrats à bas coûts, tels que les co-produits industriels comme le glycérol, qui peut être produit à hauteur de 100kg pour une tonne de biocarburant (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014).

La recherche pour la mise au point de procédés visant la production de rhamnolipides à échelle commerciale s'intensifie puisqu'une quarantaine de brevets ont été déposés depuis la fin des années 1990, dont les deux tiers au cours de ces 10 dernières années. (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014)

1.5 Les polyhydroxyalkanoates

Les polyhydroxyalkanoates (PHA) sont des polymères accumulés par certaines espèces bactériennes comme réserve énergétique. Ils peuvent être exploités pour en faire des plastiques biosourcés et biodégradables, présentant une bonne alternative aux plastiques d'origine synthétique, dont les procédés de production, dérivés de l'industrie chimique et pétrolière, sont très polluants.

Cependant, à l'heure actuelle, le marché des bioplastiques d'origine microbienne est encore faible malgré une réduction significative des coûts de production des PHA ces dernières années, qui restent élevés comparés au prix actuel des matières plastiques traditionnelles. En effet, en 2018, ils représentaient 1,4% de l'industrie des bioplastiques et leur capacité de bioproduction devrait être multipliée par 4 d'ici 2023 (<https://www.european-bioplastics.org/market/>). Plusieurs facteurs influencent le coût de production mais 50% de ces coûts sont imputables à la matière première (Koller *et al.*, 2010b). C'est pourquoi les recherches se tournent de plus en plus vers des substrats issus d'effluents industriels, qui, contrairement à des substrats comme l'amidon, le sucrose ou encore l'huile de maïs, présentent l'avantage de ne pas entrer en concurrence avec les industries de transformation de produits agricoles ou de ne pas mobiliser des terres qui pourraient être destinées à l'agriculture.

1.5.1 Nature des PHAs

Les PHA sont des polyesters aliphatiques, c'est-à-dire un assemblage de monomères de types ester possédant une chaîne latérale aliphatique. Ils ont été isolés pour la première fois en 1927 chez la bactérie *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1927), mais plusieurs autres espèces ont depuis été rapportées quant à leur production naturelle de PHA (Forsyth *et al.*, 1958). Les PHA sont accumulés sous forme d'inclusions intracytoplasmiques qui ont un rôle de réserve nutritive pour les microorganismes (Anderson *et al.*, 1990a). Plus récemment, il a été suggéré que les granules de PHA possèdent également une fonction de réserve d'acides aminés, étant donné que la dégradation des PHAs s'accompagne du relargage d'une grande quantité de protéines

structurales (PhaF) mise à la disposition du métabolisme cellulaire (Galán *et al.*, 2011). D'autre part, une accumulation intracellulaire de PHA permet d'augmenter la résistance de la cellule à différents stress environnementaux (stress salins, thermique, oxydatifs, UV ...) (Yan Hong Zhao *et al.*, 2007).

Dans le cas de cellules riches en PHA, le microscope optique permettra la visualisation des PHAs, sous forme de granules intracytoplasmique dont le diamètre varie entre 0,2 et 0,7 μm . Ces granules sont constituées de 97,7% de PHA, 1,8% de protéines et 0,5% de lipides (**Fig. 1.11**) (Koller *et al.*, 2010b).

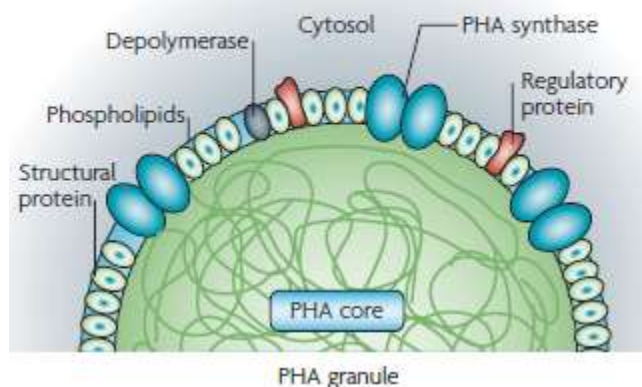


Figure 1.11 : Structure de granule de PHA chez *Ralstonia eutropha* (Rehm, 2010)

Selon la souche considérée ainsi que le substrat sur lequel la bactérie va croître, la nature des PHA synthétisés peut varier selon la longueur des chaînes latérales observées. En effet, plusieurs classes de PHAs sont recensées : les PHAs à chaîne latérale courte (scl-PHAs, pour *short chain length* PHAs, C3 \rightarrow C5) et les PHAs à chaîne latérale moyenne (mcl-PHAs, pour *medium chain length* PHAs, C6 \rightarrow C14) sont parmi les plus documentés. Plus rarement on rencontre la troisième catégorie, qui regroupe les monomères constitués de plus de 15 atomes de carbone (lcl-PHA pour Long Chain Length PHA) (Koller *et al.*, 2010b).

La longueur de la chaîne aliphatique détermine donc la nature du PHA et implique des différences physico-chimiques entre les deux classes de PHAs. Par exemple, les scl-PHAs sont cristallins, rigides et cassants alors que les mcl-PHA présentent au contraire des propriétés élastomères, ce qui ouvre la porte à de nombreuses applications biotechnologiques et biomédicales, notamment du fait de la biodégradabilité et de la biocompatibilité de ces polymères.

L'identité de l'unité monomérique est définie par la composition de la chaîne latérale, c'est-à-dire *via* le radical R et la valeur de n (Braunegg *et al.*, 1998) (**Fig.1.12**). Par exemple, le poly-(3-Hydroxy-Butyrate) (P(3-HB)) est la famille la plus abondante de PHA. Dans ce cas, n = 1 et R est un groupe méthyle. La chaîne latérale des monomères peut être saturée ou insaturée et ce sont généralement des chaînes aliphatiques. Enfin, des unités portant des fonctions aromatiques, halogènes, pseudo-halogènes ou encore alcools peuvent être synthétisés par certaines bactéries (Koller *et al.*, 2010b).

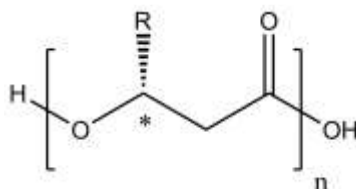


Figure 1.12 : Représentation de la structure des PHAs.

1.5.2 Les PHA synthases et organisation génétique

La biosynthèse des PHA est possible grâce à l'action d'enzymes spécifiques, les PHA synthases, qui vont permettre l'assemblage des unités monomériques en polymères. Ces enzymes montrent une affinité pour une large gamme de substrats. En effet, et à titre d'exemple, des substrats classiques tels que les carbohydrates mais aussi des substrats plus complexes, comme la mélasse de la canne à sucre (Albuquerque *et al.*, 2010) ou des huiles végétales (Song *et al.*, 2008) ont été étudiés et ont permis la biosynthèse de PHA. Une étude plus spécifique a permis d'investiguer ces synthases chez 59 espèces bactériennes, ce qui a permis de distinguer quatre classes de synthases (**Fig 1.13**) (Bernd, 2003).

Les classes I et II regroupent les bactéries possédant des enzymes constituées uniquement d'un type de sous-unité (PhaC). Des études basées sur leur spécificité de substrats *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la différence entre ces deux classes réside dans la longueur des substrats utilisés par l'enzyme. En effet, les thioesters CoA d'acides gras hydroxylés comprenant 3 à 5 atomes de carbone seront préférentiellement utilisés par la classe I de PHA synthases (type *Cupriavidus necator*) alors que les thioesters CoA d'acides gras comprenant de 6 à 14 atomes de carbone seront les substrats préférés des enzymes de la classe II (type *Pseudomonas aeruginosa*). La classe III (*Allochromatium vinosum*) et IV (*Bacillus megaterium*) sont constituées des enzymes comprenant deux types de sous-unités. Une sous-unité est commune à ces deux

classes : la sous-unité PhaC avec une similarité de séquence de 21-28% avec les classes I et II de PHA synthase, mais différent par la deuxième sous-unité : PhaE pour la classe III et PhaR pour la classe IV, qui ne présentent pas de similarité avec les autres PHA synthases (Bernd, 2003).





Classes	Sous-unités	Espèces	Substrats
I	 PhaC ~ 61-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	$3HA_{scl}\text{-CoA}$ (~C3-C5), $4HA_{scl}\text{-CoA}$, $5HA_{scl}\text{-CoA}$, $3MA_{scl}\text{-CoA}$
II	 PhaC ~ 60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3HA_{mcl}\text{-CoA}$ (~ \geq C5)
III	 PhaC PhaE ~ 40kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	$3HA_{scl}\text{-CoA}$ ($3HA_{mcl}\text{-CoA}$, $4HA\text{-CoA}$, $5HA\text{-CoA}$)
IV	 PhaC PhaR ~ 40kDa ~40 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	$3HA_{scl}\text{-CoA}$

Figure 1.13 : Les quatre classes de PHA synthases

Adapté de (Bernd, 2003)

Ces synthases font parties de voies métaboliques distinctes menant à des polymères différents. L'organisation génique des *clusters* de gènes *pha* est décrite à la **Figure 1.14**. Les organismes producteurs les plus fréquemment rencontrés sont les genres *Ralstonia* et *Pseudomonas* correspondant, aux classes I et II des PHA synthases (Solaiman *et al.*, 2005).

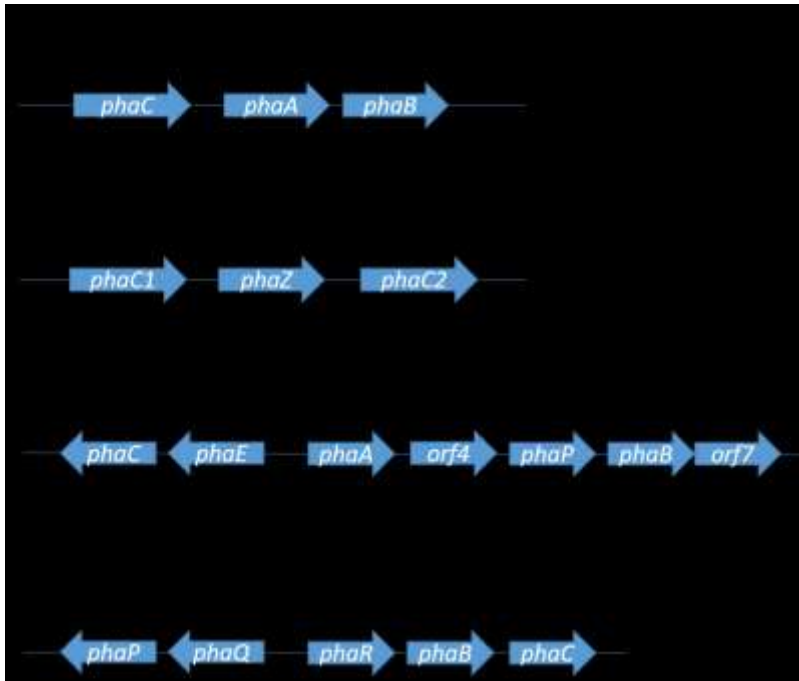


Figure 1.14 : Organisation type des gènes codant pour la biosynthèse des PHAs.

Les gènes *phaC/phaC1/phaC2* sont les gènes codant pour des PHA synthases, *phaA* code une β -cétotliolase, *phaB* pour une acétoacétyl-CoA réductase et *phaZ* une PHA dépolymérase. PhaE et PhaR sont les sous-unités de la synthèse des classes III et IV, respectivement; *phaP* code pour la phasine et *phaQ* pour une protéine de résistance multiple aux antibiotiques. Enfin ORF 4 et 7 sont des cadres ouverts de lecture pour des fonctions inconnues. (inspiré de (Solaiman *et al.*, 2005))

1.5.3 Mécanismes de déclenchement de la production des PHAs

Dépendamment de la souche considérée, les PHA peuvent être accumulés sous des conditions aérobies ou anaérobies (Chee *et al.*, 2010). Les micro-organismes capables de produire des PHA peuvent être divisés en deux groupes, en fonction des conditions de synthèse du polymère (Chee *et al.*, 2010). On distingue en effet les bactéries dont la biosynthèse des PHAs va être découplée à la croissance cellulaire et, au contraire, celle dont la biosynthèse est couplée à la croissance bactérienne. Dans le cas du premier groupe, la disponibilité de la source de carbone accompagnée de la limitation d'un autre composé tel que l'azote, le phosphore, l'oxygène dissous ou encore certains minéraux (soufre, potassium, étain, fer, magnésium...) va favoriser l'accumulation des PHAs. *Cupriavidus necator* ou encore certaines souches de *Pseudomonas* appartiennent à ce groupe.

D'un autre côté, chez les bactéries où la biosynthèse des PHAs est couplée à la croissance, aucune limitation nutritionnelle n'est requise. Ces observations ont entre autres été réalisées chez des bactéries des genres *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Rhizobium*, *Corynebacterium*... (Anderson *et al.*, 1990b).

1.5.3.1 Excès de carbone

Dans le cas où les bactéries se retrouvent brusquement face à un excès de carbone, leur anabolisme ne parvient pas à s'adapter rapidement et de ce fait la production de PHA est induite. En effet, des études ont été menées en faisant alterner des périodes de limitations nutritive suivies de périodes d'excès de source carbonée : c'est le principe du "Feast & Famine" (Serafim *et al.*, 2008). Pendant une période de limitation en nutriment, la croissance ralentit et ceci se traduit par une diminution des composants intracellulaires (ARN et protéines) nécessaires à la croissance. Si soudainement les bactéries se retrouvent en présence d'une grande quantité de carbone, le niveau d'enzymes disponibles dans les cellules est plus bas que la quantité requise pour atteindre le taux maximum de croissance. Ainsi, la bactérie bascule dans un métabolisme de stockage rapide des substrats carbonés.

1.5.3.2 Limitations nutritives

Lorsqu'une carence apparaît au niveau nutritionnel et limite la croissance, la synthèse et l'accumulation intracellulaire des PHA commencent. Pour ce faire, les bactéries mettent donc en place un métabolisme de stockage d'énergie qui se caractérise par la production de granules intracytoplasmiques de PHA. Les éléments nutritifs dont la déplétion ont cet effet sont les suivants : N, O, P, S, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Mn, Co, Cu, Ca, Sn (Koller *et al.*, 2010a). De façon intéressante, les bactéries ont la même réponse face à ces limitations, malgré leur rôle physiologique différent, suggérant une certaine similarité des mécanismes de contrôle (Babel *et al.*, 2001).

1.5.3.3 Par l'oxygène

Quand l'oxygène est limitant pour la croissance, on observe un manque d'accepteur final d'électrons et de ce fait les cofacteurs réduits ne sont pas réoxydés *via* la chaîne respiratoire. Cela entraîne l'inhibition de la citrate synthase par le NADH₂ et le NADPH₂ et le cycle de Krebs est alors réduit (Sang Yup Lee, 1996). Ainsi, une accumulation d'acétyl-CoA dans la cellule et

une diminution de la concentration en CoA-SH vont être observées (Babel *et al.*, 2001). L'inhibition de la β -cétotliolase est alors levée et le carbone en surplus est dirigé vers la production de PHA.

1.5.3.4 Par l'azote ou le phosphate

En cas de carence d'azote ou de phosphate pendant la croissance, l'acétyl-CoA et le NAD(P)H₂ ne peuvent plus être utilisés pour les voies anaboliques. Par exemple, la synthèse des acides aminés n'a plus lieu et donc le NAD(P)H₂ n'est plus consommé. Ils restent disponibles et vont inhiber la citrate synthase. Comme décrit dans le cas d'une limitation en O₂, le cycle de Krebs est ralenti, voire inhibé à son tour, et l'acétyl-CoA devient disponible pour la β -cétotliolase et donc le flux carboné est dévié vers la biosynthèse des PHA (Babel *et al.* 2001).

L'accumulation de PHA dans les cellules est maximale lorsque les bactéries sont cultivées sur des substrats contenant simultanément un excès de carbone et une limitation de l'apport d'autres substances nutritives (Shang *et al.*, 2003). En créant ce déséquilibre, les microorganismes cessent de se multiplier pour commencer à produire des PHAs. En revanche, une carence totale d'azote par exemple se traduit par une perte de rendement de production de PHA importante chez *C. necator* (Du *et al.*, 2000).

1.5.4 Régulation de la biosynthèse des PHAs

1.5.4.1 Régulation au niveau enzymatique

La synthèse des PHA est régulée au niveau enzymatique (Senior *et al.*, 1971). En effet, les concentrations intracellulaires d'acétyl-CoA et de coenzyme A ont un effet primordial sur la production des PHA. Également, la synthèse des PHA est régulée non seulement par les concentrations intracellulaires de NAD(P)H₂ mais aussi par les hauts ratios de NAD(P)H₂/NAD(P) (N Hoffmann *et al.*, 2000, In Young Lee *et al.*, 1995). De plus, plusieurs enzymes ont déjà été décrites dans la littérature comme étant impliquées dans la dégradation des PHA, comme les PHA dépolymérase, la dimère hydrolase ou encore la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (Kessler *et al.*, 2001).

Plus spécifiquement, dans le cas de *P. putida*, (Ren *et al.*, 2009) ont démontré que l'activité de PhaC dépendait du ratio *R*-3-hydroxyacyl-CoA/CoA, dans lequel le coenzyme A libre serait un inhibiteur compétitif.

1.5.4.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel

A ce jour, très peu d'informations ont pu être rapportées sur la régulation post-transcriptionnelle de la biosynthèse des PHAs. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse des PHAs serait RpoN-dépendante, alors que ce ne serait pas le cas chez *P. putida* (Nils Hoffmann et al., 2004). RpoN est un facteur sigma connu pour son implication dans la régulation de phénomènes liés à une limitation en azote, qui représente une condition favorable à la production des PHAs.

Une autre étude a démontré que l'activité de la synthase PhaC1 chez *P. putida* serait sous le contrôle de GacS (Ryan et al., 2013).

1.5.5 La biosynthèse des PHAs chez *B. thailandensis*

Bien que déjà décrits chez certaines espèces du genre *Burkholderia*, les PHAs n'ont été mis en évidence que très récemment chez *B. thailandensis*.

La première étude mentionnant les PHAs chez *B. thailandensis* a été réalisée en 2014 (Peano et al., 2014). En effet, les gènes codant pour la PHA synthase PhaC et pour le régulateur PhaR ont été mis en évidence dans les résultats d'une étude transcriptomique visant à caractériser les différences entre plusieurs conditions de culture, à savoir deux températures différentes et une limitation en oxygène. Les auteurs ont montré que la limitation en oxygène inhibait l'expression des gènes *phaC* et *phaR* chez la souche de *B. thailandensis* BtCDC272 issue d'un isolat clinique.

En revanche, Funston et al (2017) ont pour la première fois montré que *B. thailandensis* produit des PHAs, dans un contexte d'optimisation de la biosynthèse des rhamnolipides. Ils suggèrent que les voies métaboliques pour la synthèse des PHAs et des rhamnolipides sont en compétition puisque l'inactivation des gènes impliqués dans la production des PHAs favoriserait celle des rhamnolipides.

Plus récemment une autre étude a été menée pour la production simultanée de ces deux métabolites chez *B. thailandensis* (Kourmentza et al., 2018). Cette dernière a montré que *B. thailandensis* accumulait jusqu'à 60% de PHA en termes de masse sèche pendant une culture sur huile de cuisine usée comme source de carbone.

1.6 Les voies d'optimisation de production de métabolites

1.6.1 L'amélioration du potentiel de production de la souche bactérienne

Compte tenu des rendements de production connus comme inférieurs à ceux obtenus par *P. aeruginosa*, ce qui n'est pas surprenant considérant le peu de recherche ayant été effectuées sur *B. thailandensis*, il faut travailler à accroître la productivité. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Une façon est d'obtenir une bactérie surproductrice, par exemple en réalisant une mutagenèse aléatoire afin d'accroître la production chez *B. thailandensis*. Malheureusement, les micro-organismes obtenus dans ce genre de stratégies peuvent être considérés comme organismes génétiquement modifiés, aussi il convient de trouver d'autres alternatives pour satisfaire les exigences qui peuvent émaner des choix éthiques de certaines compagnies. Le concept d'évolution dirigée ou adaptative a plus récemment fait son apparition. Basé sur le principe de sélection naturelle, il s'agit en fait de reproduire, de façon accélérée, l'évolution naturelle en appliquant une contrainte afin de pouvoir sélectionner une caractéristique particulière.

1.6.1.1 La mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire consiste à induire des mutations n'importe où dans le génome de façon à générer une population de mutants qui pourront ensuite être soumis à un criblage afin de sélectionner un phénotype précis. Pour ce faire, l'ADN doit être mis en présence d'un agent mutagène. Les stratégies vont différer de par la nature de cet agent mutagène, qui peut être par exemple un rayonnement ultra-violet, un agent chimique ou encore un transposon.

1.6.1.2 L'évolution dirigée

L'évolution adaptative est un concept plus récent, basé sur le principe de sélection naturelle. Cette technique est régulièrement utilisée depuis une trentaine d'année mais est de plus en plus appliquée dans le cadre de développement de souches pour des applications biotechnologiques, et ce grâce aux progrès des techniques de séquençage (Dragosits *et al.*, 2013).

Récemment, une étude basée sur des techniques d'évolution dirigée a permis de mettre en évidence des souches dites « *hyperswarmer* » chez *P. aeruginosa*, présentant un avantage compétitif grâce au passage d'un état mono-flagellé à un état multi-flagellé, et ce

indépendamment du taux de croissance (Van Ditmarsch *et al.*, 2013). Ce type de stratégie n'a jamais été rapportée pour l'augmentation de la production de rhamnolipides mais pourrait être envisagée.

1.6.2 La définition du milieu nutritif optimal pour la production du métabolite d'intérêt

Comme décrit dans les sections précédentes, les facteurs nutritionnels jouent un rôle dans le déclenchement de la production des rhamnolipides et des PHAs. C'est pourquoi définir un milieu nutritif est une étape importante dans une stratégie d'optimisation de biosynthèse de métabolites, qui sont souvent produits en réponse à des stimuli extérieurs. Pour ce faire, une méthodologie basée sur des plans d'expériences est souvent utilisée.

1.6.3 Stratégies de fermentation

La production de métabolites représente en général la cible des procédés bio-industriels, excepté pour les procédés de production de levures par exemple où c'est la biomasse qui est le but de la fermentation.

Parmi les métabolites, on distingue les métabolites primaires, qui sont indispensables au développement du micro-organisme producteur et les métabolites secondaires qui ne contribuent pas à la croissance et sont généralement synthétisés tardivement dans le processus de croissance comme les antibiotiques, les pigments etc...

Les rhamnolipides et les PHAs appartiennent à la catégorie des métabolites secondaires.

La production de métabolites peut suivre exactement la croissance de la biomasse (correspondant aux métabolites primaires), être partiellement associée à la croissance ou bien être totalement indépendante de la croissance. Ce troisième cas est généralement associé à la production de métabolites secondaires, qui sont produits en phase stationnaire le plus souvent.

Les stratégies de culture appliquées à la production de métabolites à l'échelle industrielle impliquent en général des procédés *batch*, *fed-batch*, ou continus, qui seront décrits plus en détails ici (**Fig. 1.15**).

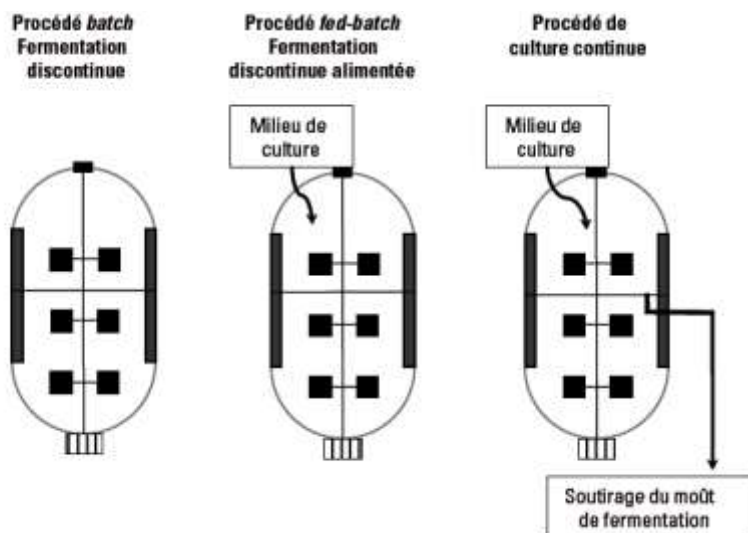


Figure 1.15 : Les procédés de fermentation liquide les plus communément utilisés dans l'industrie

Adapté de (Bourat, 1992)

1.6.3.1 Batch

Une fermentation de type *batch* (cuvée) est une culture réalisée de façon discontinue. Cela implique l'utilisation d'un système clos dans lequel les micro-organismes se développent dans un milieu de culture non renouvelé. De ce fait, la quantité de nutriments est un facteur limitant à la fermentation.

Si l'on regarde les données de la littérature concernant les cultures *batch* pour la production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, les rendements décrits varient entre 5 g/L (Gang Chen, 2004) et 112 g/L (Giani *et al.*, 1996). Cependant ces valeurs restent très incertaines dans la mesure où les méthodes de dosage de rhamnolipides n'ont souvent pas été mentionnées ou validées. En effet, une grande faiblesse des études sur les procédés de production de rhamnolipides est l'utilisation de méthodes de quantification imprécises tel que discuté dans (Irorere *et al.*, 2017).

1.6.3.2 Fed-batch

La fermentation en mode *fed-batch* est considérée comme un mode de culture continue-discontinue. Il s'agit en fait d'une culture discontinue, sans soutirage, qui est alimentée par un milieu nutritif.

Dans le cadre de la production de rhamnolipides, la culture de *P. aeruginosa* BYK-2 sur de l'huile de poisson comme source de carbone a permis d'atteindre un rendement spécifique de 0,75g/g, se traduisant par une concentration finale de rhamnolipides de 17 g/L après 216 h (Kyung Mi Lee *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont été menées en pH-stat *fed-batch*. Lee et al (1998) sont parvenus à un rendement de 4,4 g/L après 25h de culture chez *P. aeruginosa* YPJ-80 en utilisant le glucose comme source de carbone (Young Lee *et al.*, 1999) alors que d'autres chercheurs atteignent un rendement de 6 g/L en condition de glucose en excès chez *P. aeruginosa* S2 (Shan-Yu Chen *et al.*, 2007). Les concentrations rapportées par d'autres études atteignent jusqu'à 95 g/L (Giani *et al.*, 1996, Hembach, 1994).

1.6.3.3 Fermentation continue

Une fermentation en mode continu consiste à maintenir le volume du réacteur constant grâce à une alimentation ininterrompue avec un milieu nutritif stérile et en soutirant en continu le même volume de mélange biomasse-milieu liquide.

De cette façon, plusieurs paramètres sont contrôlés tels que la concentration cellulaire, le taux de croissance de la biomasse, les équilibres nutritifs du milieu et la production de métabolites.

Appliquées à la production de rhamnolipides, les fermentations continues ont principalement été menées chez *P. aeruginosa* 2659. Les sources de carbone utilisées sont principalement le glucose mais un excès de source de carbone et de phosphate couplé à une limitation en azote et en fer donnerait les meilleurs rendements, atteints à faible taux de croissance (Luis Guerra-Santos *et al.*, 1984b). Une productivité atteignant 2 g/L et un rendement de production de 0.48 g/g quand la source de carbone utilisée est l'huile de maïs a été montrée (Ochsner *et al.*, 1995).

Les procédés continus sont prometteurs dans la théorie mais peu d'études montrent leur mise en œuvre, probablement du fait de la complexité rencontrée lors de la préparation du procédé et de sa réalisation, sans compter le fait que ce genre de procédés présente un fort risque de contamination.

2 . HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS:

Comme énoncé précédemment, la production de rhamnolipides par voie bactérienne représente un enjeu industriel important. Cependant, à l'heure actuelle, le développement de ce genre de procédés reste limité du fait des nombreuses contraintes associées à la production des rhamnolipides. En effet, un des premiers inconvénients réside dans le fait que le principal producteur de rhamnolipides connu, *P. aeruginosa*, est un pathogène opportuniste exigeant un confinement de niveau 2. Il convient donc de lui trouver un homologue non pathogène, généralement plus apprécié pour les projets à échelle industrielle. Des études préliminaires (Dubeau *et al.*, 2009) ont démontré le potentiel de production de *B. thailandensis*, faisant de cette bactérie un bon candidat.

La génétique de *B. thailandensis* diffère de *P. aeruginosa* sur plusieurs aspects, de prime abord par la présence de deux opérons au lieu d'un seul codant pour les gènes du système *rhl*. Des études non publiées du laboratoire Déziel ainsi que des observations réalisées par Dubeau *et al.* (2009) montrent une contribution différentielle dans la production de rhamnolipides entre les deux opérons. En effet, chez des mutants simples, l'opéron 2 semble aboutir à la production de davantage de rhamnolipides que l'opéron 1. Cela sous-entend que les deux opérons ne sont pas transcrits de la même façon. Afin de mieux comprendre comment la production des rhamnolipides est régulée, une méthodologie basée sur la mutagenèse aléatoire par transposition pourrait s'avérer efficace afin de mettre en évidence des gènes impliqués dans une sur-production ou au contraire dans une sous-production de rhamnolipides.

Récemment, une étude basée sur des techniques d'évolution dirigée a permis de mettre en évidence des souches dites « *hyperswarmer* » chez *P. aeruginosa*. Il est envisageable que ce principe de sélection naturelle soit transposable non seulement à une autre bactérie, ici *B. thailandensis*, mais aussi à l'observation de clones surproduisant des rhamnolipides dans le cas de l'obtention d'un phénotype « *hyperswarmer* ». En effet, le *swarming* repose sur la présence de flagelle et sur la production de rhamnolipides. De ce fait, on obtiendrait une souche non modifiée génétiquement, ce qui représenterait un avantage pour les projets industriels, qui prennent aussi cet aspect en considération.

De plus, la croissance bactérienne et souvent la production de métabolites secondaires tels que les rhamnolipides sont impactées par les conditions de croissance, en particulier la composition du milieu de culture. Il convient donc, en premier lieu, de définir un milieu minimal

puis de déterminer quelles sont les sources de carbone et d'azote à privilégier pour la production optimale des rhamnolipides, dans la mesure où ce sont des éléments clé du métabolisme. Étant donné qu'un certain nombre de composés chimiques peuvent également impacter la production de rhamnolipides, leur effet sera étudié. D'autres paramètres physico-chimiques tels que la température ou le pH seront aussi évalués.

L'objectif général de ce projet est d'optimiser la production de rhamnolipides par voie bactérienne, et ce jusqu'à l'échelle fermenteur, par une bactérie non-pathogène présentant un potentiel commercial. Pour ce faire, plusieurs objectifs devront être atteints préalablement, à savoir :

Objectif 1 : Obtenir des souches surproductrices de rhamnolipides

Objectifs spécifiques :

- Par évolution dirigée, sélection phénotypique et séquençage des génomes complets des clones sélectionnés
- Mutagenèse aléatoire chez *B. thailandensis*, puis criblage et identification des sites d'insertion des transposons

Objectif 2 : Comprendre l'implication de la biosynthèse des PHA dans la production de rhamnolipides

Objectifs spécifiques :

- Étudier la production de rhamnolipides chez les mutants des gènes codant pour les PHAs
- Étudier la production des PHAs chez le double mutant *rhI*

Objectif 3 : Optimiser la production de rhamnolipides via le milieu et température de culture

Objectifs spécifiques :

- Identification de la meilleure température de culture
- Identification des meilleures sources de carbone, d'azote et de phosphore
- Réalisation d'un plan d'expérience grâce aux tables de Taguchi

3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1:

Polyhydroxyalkanoate granule accumulation makes optical density measurement an unreliable method for bacterial growth assessment in *Burkholderia thailandensis*

L'accumulation de granule de polyhydroxyalcanoate fait que la mesure de densité optique n'est pas une méthode fiable pour l'évaluation de la croissance bactérienne chez *Burkholderia thailandensis*.

Sarah Martinez and Eric Déziel*

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), 531 Boul. des Prairies, Laval, Qc H7V 1B7

*Corresponding author: eric.deziel@iaf.inrs.ca

Tel: 450 687-5010

Canadian Journal of Microbiology

Soumis le : 03 Juillet 2019

Contribution des auteurs :

SM : planification du design expérimental, réalisation des expérimentations, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

ED : planification du design expérimental, analyse des résultats et rédaction du manuscrit

Cette note a pour but de démontrer que l'utilisation de la densité optique n'est pas recommandée pour l'évaluation de la croissance bactérienne chez *B. thailandensis*.

3.1 Abstract

Optical density (OD) measurement is the standard method used in microbiology for estimating bacterial concentrations in cultures. However, most studies do not compare these measurements with viable cell counts and assume that they reflect the real cell concentration. *Burkholderia thailandensis* was recently identified as a polyhydroxyalkanoate (PHA) producer. PHA biosynthesis seems to be coded by an ortholog of the *Cupriavidus necator phaC* gene. When growing cultures of wildtype strain E264 and an isogenic *phaC*- mutant, we noted a difference in their OD₆₀₀ values, although viable cell counts indicated similar growth. Investigating the cellular morphologies of both strains, we found that under our conditions the wildtype strain was full of PHA granules, deforming the cells, while the mutant contained no granules. These factors apparently affected the light scattering, making the OD₆₀₀ values no longer representative of cell density. We show a direct correlation between OD₆₀₀ values and the accumulation of PHA. We conclude that OD measurement is unreliable for growth evaluation of *B. thailandensis* because of PHA production. This study also suggests that *B. thailandensis* could represent an excellent candidate for PHA bioproduction. Correlation between OD measurements and viable cell counts should be verified on any study realized in *B. thailandensis*.

3.2 Importance

Optical density (OD) measurement for evaluating the growth of a population of bacteria is a central technique in microbiology. We found that accumulation of important quantities of polyhydroxyalkanoate (PHA) granules in the cytoplasmic space of a bacterium hinders the reliable use of this standard technique, presumably by distorted light scattering. Furthermore, we present data supporting that *Burkholderia thailandensis* is an excellent producer of PHAs, and identified the PHA synthase responsible for this production.

3.3 Introduction

The soil saprophyte *Burkholderia thailandensis* was recently identified as a producer of polyhydroxyalkanoates (PHAs) (Funston *et al.*, 2017) and then studied for the co-production of PHAs and rhamnolipid in used cook oil (Kourmentza *et al.*, 2018). PHAs are polymers of hydroxylated fatty acids that are synthesized by different prokaryotic microorganisms as intracellular carbon storage material (Anderson *et al.*, 1990b). PHA granules are produced when

carbon is present in excess combined with a nitrogen or phosphate limitation (Poblete-Castro *et al.*, 2012).

PHA synthases and their genetic organisation are well characterized (Rehm *et al.*, 1999), with two classes of PHAs principally documented: class 1 for short chain length-PHAs (scl-PHAs), products of *phaC-phaA-phaB* gene clusters featured in the *Ralstonia/Cupriavidus* genus and class 2 for medium chain length PHAs (mcl-PHAs), products of *phaC1-phaZ-phaC2* gene clusters typical of the *Pseudomonas* genus.

PHA synthases are encoded by the *phaC* homologues (Solaiman *et al.*, 2005). Investigating the genome of the prototypical *B. thailandensis* strain E264, (Funston *et al.*, 2017) reported that the BTH_I2255 gene shows similarity with *Pseudomonas*-type poly-(3-hydroxyalkanoate) polymerases coded by *phaC1* and *phaC2* with a percentage of identity of 40 and 39% respectively. Actually, we rather found a 75% identity between BTH_I2255 and the ortholog of the *C. necator* PHA biosynthesis gene *phaC* (NC_015726.1). Furthermore, the genomic context of this gene reveals the immediate proximity of *phaA* and *phaB* orthologs, coding an acetyl-CoA acetyltransferase and an acetoacetyl-CoA reductase, responsible for the precursors biosynthesis, with 82% and 83% identity respectively with the corresponding *C. necator* genes (CAJ92573.1 and CAJ92574.1), suggesting that a complete class 1 PHA biosynthesis machinery is present in *B. thailandensis* for the production of scl-PHAs. This is compatible with the affiliation of both *Burkholderia* and *Cupriavidus* in the class β -Proteobacteria. We indeed also found an ortholog of the *Pseudomonas aeruginosa* mcl-PHA biosynthesis gene, *phaC1* (NC_002516.2). However, it corresponds to locus tag BTH_II0418, with 74% identity. No *P. aeruginosa phaZ* gene ortholog was found, indicating that a mcl-PHAs biosynthesis is not complete in *B. thailandensis*.

Optical density (OD) measurements at 600 nm are the standard approach used in microbiology labs for estimating the bacterial concentration in a liquid culture (Stevenson *et al.*, 2016). With homogenous cultures, it is generally found that OD remains proportional to bacterial density throughout the positive phases of growth of the cultures (Monod, 1942). When this requirement is fulfilled, OD determinations can provide an adequate and extremely convenient method of estimating bacterial density. However, these growth estimations can be misleading. Indeed, there are relatively few studies comparing these estimations with viable cell counts. Optical density is a measure of the light scattered by the bacteria present in the suspension. Indeed, in a non-scattering sample, the attenuation in light transmission between the light source and the detector is caused by the absorbance of light by the sample. But, in a scattering sample,

such as a bacterial suspension, the light reaching the detector is further reduced by the scattering of light. This decrease creates the illusion of an increase in sample absorbance, while it is actually a measure of turbidity (Matlock *et al.*, 2011).

We demonstrate here that PHAs accumulated as intracellular granules in *B. thailandensis* cells affect the size and shape of the bacteria sufficiently to increase the possibility of multiple light scattering events, making OD₆₀₀ values unreliable for growth evaluation.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Strains and growth conditions.

Wildtype *B. thailandensis* E264 (WT)(PJ Brett *et al.*, 1997), and isogenic *phaC*- and *phaC1*- mutants obtained from the transposon mutant library (Gallagher *et al.*, 2013) were grown in 3 mL Nutrient broth (NB; Difco) medium supplemented with 2% (w/v) glycerol. The cultures were incubated at 30°C with rotation at 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada) for 16h. These seed cultures were then diluted in flasks containing 25 mL of NB medium supplemented with 2% (w/v) glycerol at OD₆₀₀ = 0.1 and then incubated at 30°C with agitation (200 rpm) in a gyratory shaker (Infors) for 5 days. Samples were collected daily and bacterial growth was estimated by OD₆₀₀ measurements (Nanodrop) and by viable counts, determined by plating serial dilutions on LB agar plates, incubated for 24 hours at 37°C. Colonies were counted to determine bacterial cell count (CFU/mL) for each time point.

3.4.2 PHA quantification by Nile Blue staining.

Culture samples of 100 µL were collected at regular time intervals and were centrifuged for 3 min at 10,000 x *g*. Supernatants were discarded and pellets were suspended in 100 µL water. Samples were heated at 100°C for 10 min and transferred on ice for 5 min to lyse the cells. Samples were then centrifuged for 3 min at 10,800 x *g*, supernatants discarded and pellets suspended in 100 µL water. Samples were transferred to a 96-well plate and an equal volume of a 0.02% (w/v) Nile Blue (Sigma-Aldrich) solution was added to each well. After a 4 min incubation, the fluorescence intensity (excitation 490 nm / emission 590 nm) was measured using a Cytation (Biotek) multimode microplate reader.

3.4.3 Transmission electron microscopy.

After four days of incubation, 1 mL of each culture were collected and transferred into a sterile 1.5 microcentrifuge tube. After centrifugation (3 min, 8,000 x g), the supernatant was discarded and cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer saline and kept at 4°C overnight. Cells were washed three times at room temperature with 200 µL of washing solution (0.05 M cacodylate sodium, 3% sucrose). Staining was performed with 1.3% osmium tetroxide in collidine buffer. Fixed stained material was progressively dehydrated with increasing concentrations of acetone (25-95%). The material was kept overnight in a 1:1 volume mixture of Spurr resin and acetone, then immersed twice each 2 hours, in a bath of Spurr mixtures. The block containing fixed cells was cut into small pieces, placed in BEEM capsules, filled with Spurr resin and held at room temperature for 16 hours and then polymerized at 60°C for 20-30 hours. Ultrathin sections (70-100 nm thick) were examined by a Hitachi H-7100 electron microscope with an accelerating voltage of 75 kV.

3.5 Results and discussion

3.5.1 Optical density at 600 nm is not representative for growth measurement in *B. thailandensis*.

The wildtype (WT) strain was *B. thailandensis* E264. Isogenic *phaC*- (BT10416 E264 *phbC148::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT*) and *phaC1*- (BT05079 E264 *BTH_II0418-187::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT*) mutants were obtained from the transposon mutant library (Gallagher *et al.*, 2013). WT, *phaC*- and *phaC1*- mutants were grown in 3 mL Nutrient broth (NB; BD Difco, Mississauga, ON, Canada) medium with 2% (w/v) glycerol. The cultures were incubated at 30°C with rotation at 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada) for 16h. These seed cultures were then diluted in flasks containing 25 mL of NB medium supplemented with 2% (w/v) glycerol to an OD₆₀₀ = 0.1 and incubated at 30°C with agitation (200 rpm) in a gyratory shaker (Infors) for 4 days. Samples were collected daily and bacterial growth was estimated by OD₆₀₀ measurements (**Fig. 3.1A**) and by viable counts (**Fig. 3.1B**), determined by plating serial dilutions on LB agar plates, incubated for 24 hours at 37°C. Colonies were counted to determine bacterial cell count (CFU/mL) for each time points.

Interestingly, OD₆₀₀ measurements indicated that the *phaC*- mutant reached lower values than the WT strain (**Fig. 3.1A**). On the other hand, loss of *phaC1* did not affect OD₆₀₀ values. This

was suggesting that the *phaC*⁻ mutant has a growth defect. Unexpectedly, CFU counts revealed the concentration of live bacteria present was similar for all three strains (Fig. 3.1B). Thus, there is a lack of correlation between OD measures and cell density.

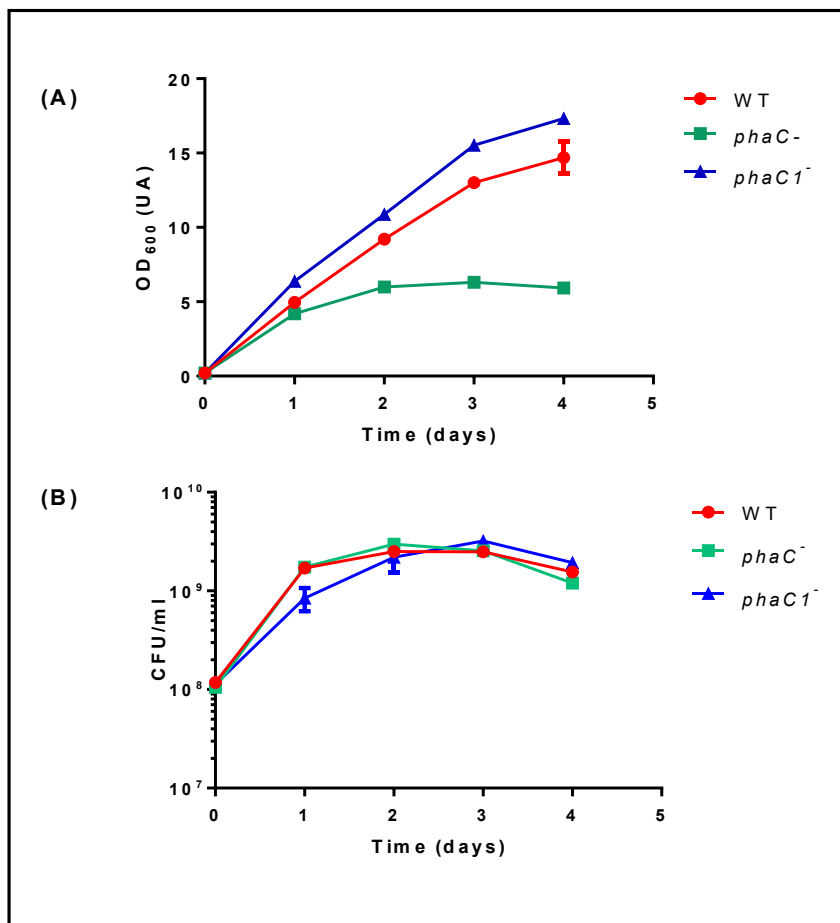


Figure 3.1: Optical densities at 600 nm and CFUs may not be correlated in *B. thailandensis* cultures.

Samples were collected daily and bacterial growth was estimated by OD600 measurements (A) and by viable counts (B), The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures).

We identified the *phaC* gene as responsible for the PHA production in *B. thailandensis*. This is consistent with the PHA composition described in a recent study, where scl-PHA, also named polyhydroxybutyrate (PHB), were characterized (Kourmentza *et al.*, 2018).

3.5.2 PHA production is responsible for the OD difference between the wildtype strain and *phaC*- mutant.

During cultivation, PHA production was verified for the three strains. Two strategies were employed. First, PHA biosynthesis was evaluated by Nile blue staining and fluorescence quantification. Indeed, Nile blue is a fluorescent dye specific for PHA granules (Page *et al.*, 1996). Nile Blue staining relies on a linear correlation obtained between intracellular PHA concentrations and the corresponding fluorescence intensities (Zuriani *et al.*, 2013).

PHA accumulation was measured as described by (Oshiki *et al.*, 2011), with some adjustments. Briefly, samples were collected and submitted to a heat choc. Addition of Nile blue in the lysate allowed to evaluate PHA production by measuring emitted fluorescence. Data show that the *phaC* mutant does not produce PHAs as no fluorescence was detected (**Fig. 3.2A**). In contrast the WT samples showed increasing fluorescence values, indicating the presence of PHA granules, as did the *phaC1*- mutant, strongly suggesting that this gene is not involved in PHA production, at least under our conditions.

Next, to confirm the data obtained with the Nile blue staining, samples were prepared and observed using transmission electron microscopy (TEM) (**Fig. 3.2B** and **3.2C**). Under our culture conditions, the WT strain contained an average of seven big PHA granules/cell, inducing a cell deformation (**Fig. 3.2B**). Indeed, WT cells were bulkier than *phaC*- mutant cells, for which TEM confirmed the absence of PHA granules.

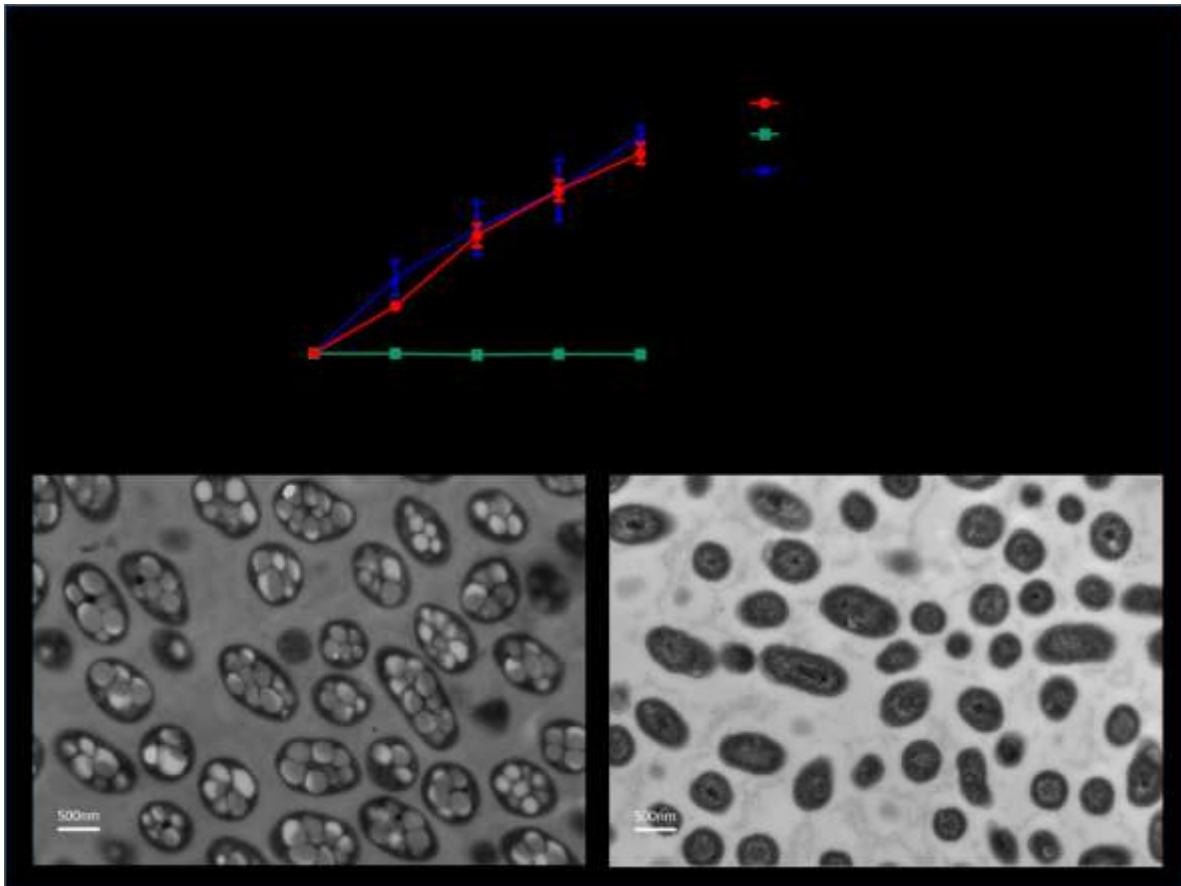


Figure 3.2: *phaC* mutant of *B. thailandensis* E264 do not produce PHAs.

(A) PHA production for the wild type strain and the *phaC*- and *phaC1*- mutants measured by Nile blue staining. (B) and (C) are TEM images (x10.000) for the wildtype strain and the *phaC*- mutant respectively.

Obviously, the shape or size of cells can have an impact on OD measurements (Koch *et al.*, 1968). More recently, the effects of cell size variation was observed with bead suspensions and then confirmed in cultures of *E. coli* and yeast (Stevenson *et al.*, 2016). A change in cell size throughout the growth curve of an *E. coli* grown under sub-lethal concentrations of ampicillin was demonstrated. This treatment induced a filamentation of the bacteria and thus caused a substantial deviation between OD₆₀₀ and bacterial concentration. During the initial part of the log phase, OD₆₀₀ and bacterial concentration showed the same time dependency but later the cell number remains roughly constant while the OD₆₀₀ increases (Stevenson *et al.*, 2016). We observed a similar trend here, as when growth seems to have stopped for both the WT and the *phaC* mutant when viable cell counts are considered, the OD₆₀₀ keeps increasing.

At least under our culture conditions, OD_{600} is actually an indicator of PHA biosynthesis for *B. thailandensis*. Indeed, when PHA production is compared to the OD_{600} , the trend line is linear with an $R^2=0.9845$, indicating that PHA biosynthesis is correlated to the OD_{600} values (Fig. 3.3).

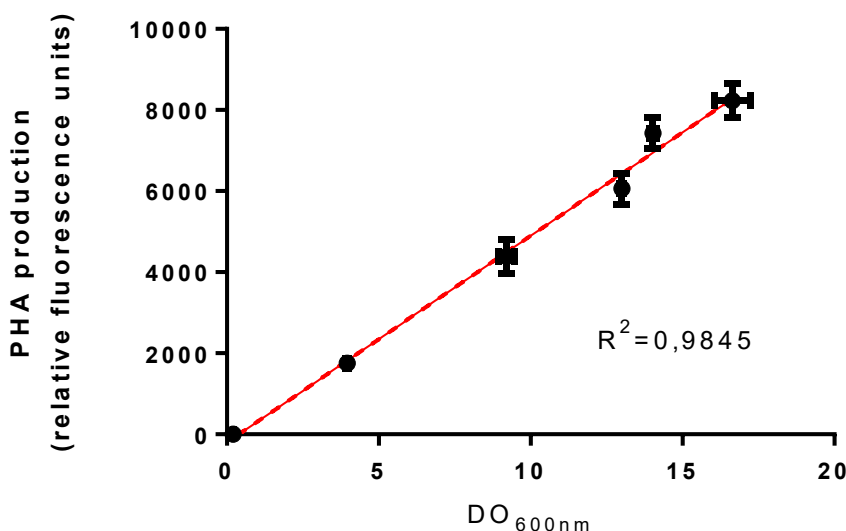


Figure 3.3: PHA biosynthesis is correlated to OD_{600} measures.

PHA biosynthesis is represented depending on the OD_{600} values measured during the growth of the E264 strain in NB medium supplemented with 2% glycerol. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures).

3.6 Conclusion

In conclusion, we demonstrated that while *B. thailandensis* appears to harbour two distinct PHA biosynthases, only class 1 *phaC* is actually involved in PHA production and not the class 2 *phaC1* homolog. Interestingly, we found here that OD_{600} measurement is not reliable for growth evaluation of *B. thailandensis* when the growth conditions allow PHA production. This is consistent with other studies mentioning that turbidimetry is disturbed by the PHA amounts produced. For instance, in *Pseudomonas* species, among which are found well-known PHA producers such as *P. aeruginosa* or *P. putida*, growth measurements in term of viable cells was suggested by using gravimetric methods (Escapa *et al.*, 2013) since dry cell mass values for growth evaluation have to be adjusted to the PHA content of cells (Escapa *et al.*, 2012).

Also, we clearly show that *B. thailandensis* has an excellent potential as a PHA producer, probably comparable to *C. necator* (Mravec *et al.*, 2016). PHA production in *B. sacchari* and *B. cepacia* were recently reported, with PHB contents around 88% and 74%, respectively, in a medium containing detoxified wood hydrolyzates (Kucera *et al.*, 2017). Furthermore, Kourmentza *et al* (2018) reported that PHB content represents 60% of the dry cell mass when *B. thailandensis* was grown on used cooking oil (Kourmentza *et al.*, 2018). All together, these observations suggest that studies using optical density measurements for growth assessment might be inconsistent for *Burkholderia* species.

3.7 Funding informations

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research of Canada and by the Canadian Research Chairs program.

3.8 Acknowledgements

Marie-Christine Groleau for insightful comments and Arnaldo Nakamura for TEM images.

4 . PRESENTATION DE L'ARTICLE 2:

“The ScmR regulator controls both rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production in *Burkholderia thailandensis*”

Le régulateur ScmR contrôle la production des rhamnolipides et des polyhydroxyalcanoates chez *Burkholderia thailandensis*

Sarah Martinez, Adeline Humery, Marie-Christine Groleau et Eric Déziel*

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique
(INRS), 531 Boul. des Prairies, Laval, Qc H7V 1B7

*Corresponding author: INRS - Institut Armand-Frappier Santé Biotechnologie

531, Boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

e-mail: eric.deziel@iaf.inrs.ca

Microbial Cell Factory

Soumis le : 4 Juillet 2019

Contribution des auteurs :

SM : Planification du design expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, rédaction du manuscrit.

AH : Construction des rapporteurs *rhIA1-lacZ*, *rhIA2-lacZ* et des souches *scmR-* +*rhIA1-lacZ*, *scmR-* + *rhIA2-lacZ*.

MCG : Construction du plasmide pMCG11 et révision de l'article.

ED : Planification du design expérimental, analyse des résultats, rédaction du manuscrit.

Les rhamnolipides sont la famille des glycolipides les plus étudiés, surtout chez *Pseudomonas aeruginosa* qui reste la bactérie la plus documentée puisqu'il s'agit de la bactérie dans laquelle les rhamnolipides ont été découverts en premier lieu. Cependant, du fait de sa pathogénicité, entraînant des mesures de confinement de niveau 2, les recherches se portent de plus en plus vers des bactéries non pathogènes pour le développement des bioprocédés. Parmi elles, on trouve *B. thailandensis* qui présente l'avantage de produire un congénère majoritaire de rhamnolipides, facilitant les procédés de purification subséquents. Pour ces deux principales raisons, *B. thailandensis* représente un candidat idéal pour un travail d'optimisation de la production des rhamnolipides. Cependant, les mécanismes reliés à la production de rhamnolipides sont très peu connus chez cette bactérie, c'est pourquoi il est essentiel de mettre en évidence des gènes, et donc les protéines associées, impliqués directement ou non dans leur biosynthèse. La mutagenèse aléatoire est une méthode couramment utilisée à ces fins.

4.1 Abstract

Background: Rhamnolipids are surface-active agents of microbial origin considered as potential alternatives to synthetic surfactants. Contrary to the traditional rhamnolipid-producing bacterial species *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, *B. thailandensis* is a non-pathogenic rhamnolipid producer that could represent an interesting candidate for use in commercial processes. However, current bioprocesses for rhamnolipid production by this bacterium are not efficient enough, mainly due to low yields. Unfortunately, regulation of rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis* is poorly understood, and identifying regulatory factors could help increase the yield these valuable metabolites. We performed a random mutagenesis screening by transposon insertion to identify genes directing rhamnolipid production in *B. thailandensis*.

Results: The best rhamnolipid overproducer transposant we identified harbored a mutation in the *scmR* gene, which was recently described to encode as a secondary metabolite regulator during stationary phase in *B. thailandensis*. We investigated the impact of the *scmR* mutation on rhamnolipid biosynthesis and cell growth. Because biosynthesis of rhamnolipids and PHAs could share the same pool of lipid precursor, we also investigate the effect of ScmR on PHAs production. We found that production of both rhamnolipids and PHAs were affected by ScmR during the logarithmic growth phase. In addition we demonstrate that ScmR downregulates the production of rhamnolipids by affecting the expression of both *rhl* operons. Finally our results indicate that PHA biosynthesis was reduced in the *scmR*- mutant.

Conclusions: This study reveals the ScmR transcriptional regulator as a repressor of rhamnolipid production and an activator of PHAs biosynthesis, providing an interesting approach to strain engineering to develop efficient bioprocesses.

4.2 Importance

A new regulator controlling the rhamnolipid biosynthesis was discovered using the random mutagenesis strategy, allowing an enhancement of the production.

4.3 Introduction

Rhamnolipids are biosurfactants first identified in *Pseudomonas aeruginosa* cultures (Jarvis *et al.*, 1949). The amphiphilic character of rhamnolipids is due to the presence of a hydrophilic polar head, constituted by one or more rhamnose molecules, and a hydrophobic apolar tail, composed by a dimer of two esterified β -hydroxy-fatty acids. This diverse group of molecules comprises more than 60 reported congeners (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Variations in the sugar and in the hydrophobic moiety lead to structural differences between these congeners. Their tensioactive properties, low toxicity and high biodegradability makes them suitable for a variety of applications (Banat *et al.*, 2000, Nitschke *et al.*, 2005). They are biodegradable and therefore have a low environmental impact (Lang *et al.*, 1999).

Rhamnolipid production has been extensively investigated and the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* remains the principal producing bacterial species. However, we showed that *B. thailandensis* represents a good candidate for industrial scale production of rhamnolipids (Dubeau *et al.*, 2009). Indeed, this bacterium is non-pathogenic and produces one main congener, facilitating its purification. *B. thailandensis* was also recently found to be a producer of polyhydroxyalkanoates (PHAs), another valuable metabolite (Funston *et al.*, 2017, Kourmentza *et al.*, 2018, Martinez *et al.*, 2019). PHA biosynthesis was suggested to be in competition with rhamnolipid production (Funston *et al.*, 2017). Unfortunately, the production processes for both rhamnolipids and PHAs are not optimized because of the lack of knowledge about how *B. thailandensis* regulates the synthesis of these metabolites. Two *rhl* operons are responsible for rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009). While the global level of transcription of *rhl* genes was studied for the temperature effect on the rhamnolipid production (Funston *et al.*, 2016), the independent regulation of these two operons has not been explored yet.

Rhamnolipid production is regulated by quorum sensing in many bacteria. For instance, in *P. aeruginosa* and in *Burkholderia glumae*, *rhl* biosynthesis genes are under the control of distinct quorum sensing systems (C Majerczyk *et al.*, 2014b, Nickzad *et al.*, 2016, Soberón-Chávez *et al.*, 2005). In addition, *rhlA1* gene expression was reported to be impacted by mutation in quorum sensing systems in *B. thailandensis* (C Majerczyk *et al.*, 2014a).

A LysR-type transcriptional regulator (LTTR) designated ScmR (for Secondary Metabolite Regulator) was recently identified in *B. thailandensis* (Mao *et al.*, 2017), but no impact on the *rhl* operons was described. As a key step in the development of rhamnolipid production processes

based on *B. thailandensis*, the aim of the present study was to identify genes involved in the regulation of rhamnolipid biosynthesis. We found that ScmR acts as a repressor of rhamnolipid production, negatively impacting the expression of the two *rhl* operons. We also investigated the effect of the *scmR* inactivation on the production of PHA and found that ScmR positively regulates the polymer biosynthesis.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Strains and plasmids

Strains used in this study are presented in **Table 4.1**.

Tableau 4.1: Strains and plasmid used in this study.

Strains	Characteristics	Reference
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Wild type strain	(Paul J Brett <i>et al.</i> , 1998)
<i>B. thailandensis</i> <i>scmR</i> mutant ED1023	E264 <i>scmR</i> ::pUT-mini-Tn5-Km; Km ^R	Lab collection
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
<i>B. thailandensis</i> <i>ocb1</i> - mutant BT01779	E264 BTH_II1071-151::ISlacZ hah, Tc ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
Plasmids		
pIT2	Suicide vector ISlacZ/hah transposon, Tc ^R	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003)
pGP704N- <i>dfr</i>	Source of the tmp resistance gene <i>dfrII</i>	(Lesic <i>et al.</i> , 2005)

pTZ110	<i>LacZ</i> operon fusion vector	(Schweizer <i>et al.</i> , 2001)
pGEM®-T Easy	Cloning vector, Bla ^R	Promega
pAH1	Promoter region of <i>rhIA1</i> inserted in pGEM®-T Easy	This study
pAH2	Promoter region of <i>rhIA2</i> inserted in pGEM®-T Easy	This study
pMCG11	pTZ110:: <i>dhfRII</i> , Tmp ^R	This study
pAH5	Promoter region of <i>rhIA1</i> inserted in pMCG11, Tmp ^R	This study
pAH8	Promoter region of <i>rhIA2</i> inserted in pMCG11, Tmp ^R	This study
pME6000	Broad-host-range cloning vector; Tc ^R	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)
pJPD03	<i>scmR</i> gene inserted in BamHI-HindIII sites in pME6000; Tc ^R	This study

Tc: tetracycline; Tmp: trimethoprim, Bla: beta-lactamase, Km: kanamycin

4.4.2 Growth conditions

Strains were routinely grown from frozen stocks at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD Difco, Mississauga, ON, Canada) in a TC-7 roller drum at 240 rpm (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. For rhamnolipid production, nutrient broth (NB) medium (BD Difco,) supplemented with 2 or 4% (w/v) glycerol was used. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: 10 µg ml⁻¹ tetracycline (Tc) and 100 µg ml⁻¹ trimethoprim (Tmp) for *B. thailandensis* and 15 µg ml⁻¹ tetracycline (Tc), 100 µg ml⁻¹ carbenicillin (Cb), and 100 µg ml⁻¹ trimethoprim (Tmp) for *E. coli*. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently. For blue-white screening, a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal, 2% w/v) solution was added in LB plates for final concentration 40 µg ml⁻¹.

4.4.3 Random mutagenesis

A library of *B. thailandensis* transconjugants was generated as follows. Plasmid pIT2 carrying the IS*lacZ*/hah transposon was transferred in *B. thailandensis* E264 by conjugation with *E. coli* χ 7213 (*asd*-) strain (Jacobs *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2002). NB agar supplemented with 4% glycerol and tetracycline was used for selection of transposants. The screening was realized using atomized mineral oil assay as described (Burch *et al.*, 2010), with a few modifications. Sudan red was added to mineral oil to provide a better contrast (500mg/100mL). The presence of a halo surrounding colonies indicates the production of rhamnolipids caused by the amphiphilic properties of surfactants; the diameter the halo was measured and compared to a WT control. Clones with larger halos were selected as potential better rhamnolipid producers. Clones were further confirmed for their rhamnolipid production in liquid cultures.

4.4.4 Identification of transposon insertion sites by sequencing (Tn-seq)

Total DNA was extracted using a mechanical lysis method as previously described (Durand *et al.*, 2015). DNA concentrations were estimated using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following the instructions of the manufacturer. Total genomic DNA from the selected mutants were pooled together and sent to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre for transposon insertion sequencing (MiSeq Illumina). Generated Tn-Seq reads were analyzed as follows: Sequences were trimmed in order to remove the 3' bases from the adaptor used for sequencing. Then, only the 4 last bases from the cassette were conserved: TCAG. All the resulting sequences were alphabetically sorted and clustered. For each cluster, a unique sequence was determined and sequence alignments with *B. thailandensis* E264 genome were realized on Burkholderia.com, allowing the identification of the insertion site.

4.4.5 Construction of plasmids

For pMCG11 construction, the *dhfrII* gene was amplified by PCR from pGP704N-dfr using primers dhfrFPstI (5'-AAAAGTGCAGATATCTGAGCTGTTGACAATTAATCATCC-3') and dhfrRPstI (5'-AAAAGTGCAGCCACCAAAGTTAGTTGATGCGTTCAAGCG-3') and cloned inside the PstI site in the pTZ110 vector. The construct was transformed in *E. coli* DH5 α and trimethoprim was used for selection.

For pAH1 and pAH2 constructions, the two promoter regions and the first 102 pb of BTH_II1081 (*rhIA1*) and BTH_II1875 (*rhIA2*) genes were amplified by PCR using forward primers

Thai-UpOp1-F (5'-GGAATTCCTCCGAAGGATATCGGTTTTT-3') for *rhlA1* and Thai-UpOp2-F (5'-CCGGAATTCCTCCGATTCACCACAATGGA-3') for *rhlA2* respectively, and the reverse primer Thai-UpOp-R (5'-CGGGATCCGTTACGAGGATGACCGTCT-3'). The PCR products were cloned in the pGEM®-T Easy (Promega) to generate vectors pAH1 and pAH2. DH5 α cells were transformed and positive clones were selected on LB plate containing carbenicillin and X-gal. The pAH1 and pAH2 plasmids were digested by BamH1 (NEB) and Ecl136II (Thermo Fisher) and the 1081 bp and 847 bp fragments respectively were ligated in StuI (NEB) and BamHI (NEB)-digested pMCG11 to generate pAH5 et pAH8. The two reporters were independently transferred either into *B. thailandensis* wild type or in the *scmR*- mutant ED1023 by electroporation (Dennis *et al.*, 1995).

To generate the pJPD03 vector, the *scmR* gene (BTH_I1403) was amplified by PCR from *B. thailandensis* genomic DNA using primers BTH_I1403-F-KpnI (5'-CGGGGTACCCCGAAGACAAGCCCTGTGCTGAT-3') and BTH_I1403-R-HindIII (5'-CCCAAGCTTGGGAGGTGCGCGTCAGTTTACTT-3') and cloned inside the KpnI and HindIII sites of the pME6000 vector. The construct was transformed in *E. coli* DH5 α and X-gal was used for the detection of the clones carrying the plasmid on plates containing tetracycline for selection. Then pJPD03 was transferred in the *scmR*- mutant ED1023 by electroporation (Dennis *et al.*, 1995).

4.4.6 β -galactosidase activity assays

β -galactosidase assays were performed as described (JH Miller, 1972) with some modifications. Normalization of the activity was calculated using colony-forming units (CFU)/mL instead of OD₆₀₀.

4.4.7 Rhamnolipid quantification by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)

Rhamnolipid concentrations in cultures were determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry as previously described (Dubeau *et al.*, 2009), with some modifications. After six days of growth, 1 mL culture samples were retrieved and the OD₆₀₀ was measured (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). The samples were centrifuged at 16,800 \times g for 10 min to remove the bacteria. A 500 μ l sample of supernatant was transferred to an HPLC vial and 500 μ l methanol containing 10 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) as the internal standard were added. The samples were then analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada)

equipped with a C8 reverse-phase column (EVO, Phenomenex) using a water/acetonitrile gradient with a constant 2 mmol/L concentration of ammonium acetate (Dubeau *et al.*, 2009). The detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode.

4.4.8 Quantification of polyhydroxyalkanoates

PHA concentration was estimated as described (Oshiki *et al.*, 2011), with some adjustments. Culture samples (100 μ L) were collected and centrifuged during 3 min at 16,800 $\times g$. Supernatants were discarded and pellets were suspended in 100 μ L of water. Samples were heated at 100°C for 10 min and immediately transferred on ice for 5 min. The samples were then centrifuged for 3 min at 16,800 $\times g$, pellets were suspended in 100 μ L of water, which were transferred to a 96-well microtiter and an equal volume of a 0.02% (w/v) Nile Blue (Sigma Aldrich) solution was added to each well. After 4 min of incubation, the intensity of fluorescence was determined using a Cytation 3 multimode plate reader (Biotek), using excitation and emission wavelengths of 490 and 590 nm, respectively (**Section 3**).

4.4.9 Transmission electron microscopy (TEM) for visualisation of PHA granules

One mL from 4-day old cultures was collected and transferred into a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube. After centrifugation (3 min, 8,000 $\times g$), supernatant was discarded and cells were fixed using 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer saline then kept at 4°C overnight. Cells were washed three times at room temperature with 200 μ L of washing solution (50 mM cacodylate sodium, 3% sucrose). Staining was performed as previously described (**Section 3**). Ultrathin sections (70-100 nm thick) were examined with a Hitachi H-7100 electron microscope with an accelerating voltage of 75 kV.

4.5 Results

4.5.1 Random mutagenesis reveals a rhamnolipid overproducer of *B. thailandensis* E264.

Following random transposon mutagenesis, about 25,000 colonies of *B. thailandensis* E264 were screened for rhamnolipid production. Among these transposants, one interesting candidate named M63 was selected for its rhamnolipid-overproducing phenotype, based on the diameter of the halo observed around the colony following spraying of a mist of Sudan Red-

mineral oil (**Fig. 4.1A**). Diameter measurements of the emulsification zone in the plates were 2.83 ± 0.04 cm and 5.43 ± 0.45 cm, meaning an area of 6.3 ± 0.21 cm² and 22.89 ± 3.85 cm², respectively. Statistical analysis using T-test indicated that both diameter and area values were significant with $P_{value}=0.0121$ and $P_{value}=0.0224$, respectively.

In order to validate the phenotype we observed on solid media, rhamnolipid production of the M63 mutant was then quantified in 5 days-old liquid cultures. Our data confirmed the previous selection by oil vaporisation since the M63 mutant showed a three times higher rhamnolipid production than the WT (**Fig. 4.1B**). TnSeq analysis generated one unique sequence (**Tableau 4.2**). Sequence analysis revealed that the transposon was inserted in the *scmR* gene (BTH_I1403) in M63.

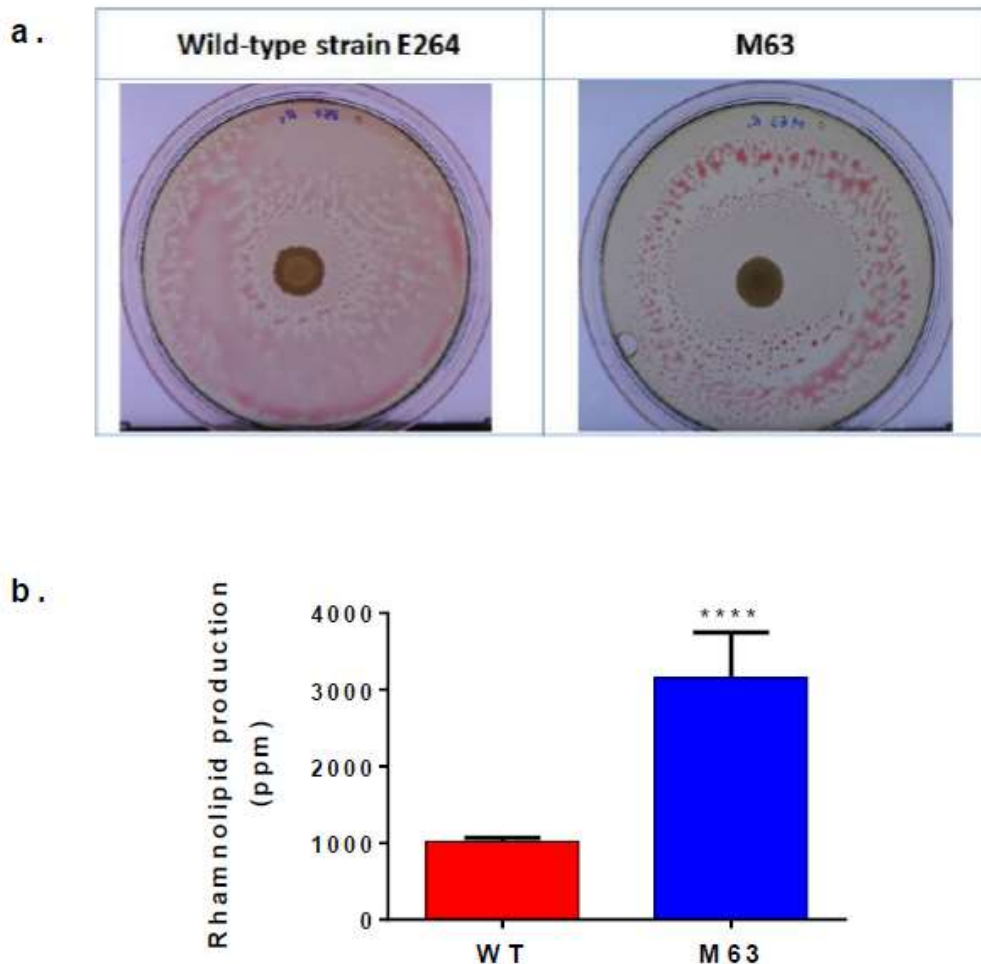


Figure 4.1: Random mutagenesis identifies a rhamnolipid overproducer of *B. thailandensis* E264.

(A) Phenotypic selection by oil vaporization, (B) Rhamnolipid quantification after 5 days of culture in NB + 4% glycerol. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures). Asterisk indicates statistically significant differences (*, $P < 0.05$) in paired Student's t tests.

Tableau 4.2 : The transposon is inserted in the BTH_I1403 locus for M63 mutant.

TCAGCGCCTCGAGCTGATCGAATTCCTCGAGGAGCGCCCGGCAGCCGTCGAGGT		
AGCGGATGCCCGCTCCGTCAGCGACAGATTGCGTGTGTCGTGGATGGATGAGAC	100%	BTH_I1403
GCGTGTTCAGATGTGTTTCGAGCATCGEGATCGAACGAGATCG		

4.5.2 A *scmR*- mutant overproduces rhamnolipids

The M63 mutant was shown to have a transposon inserted in the BTH_I1403 locus, encoding for the LTTR ScmR. Interestingly, this regulator was recently shown to influence production of many secondary metabolites in *B. thalandsis* E264 (Mao *et al.*, 2017). In order to characterize this mutant further, we performed cultures of the corresponding *scmR*- mutant ED1023 in 125 mL baffled flasks containing 25 mL of NB medium with 2% glycerol. Samples were collected daily. Growth was evaluated by OD₆₀₀ measurements and colony forming units per mL (CFU/mL) and rhamnolipid production was measured by LC-MS analysis. Intriguingly, OD₆₀₀ measurements suggested a growth defect for this mutant under our conditions (**Fig. 4.2A**). However, **Figure 4.2B** shows that both the WT and the *scmR*- mutant actually exhibit similar growth profiles. This apparent discrepancy is explained below. Rhamnolipid production was confirmed to rapidly reach three times the WT levels within 2 days, then accumulation essentially stopped (**Fig. 4.2C**). Complementation of the *scmR*- mutant with a plasmid-borne *scmR* gene restored, partially, the production towards WT levels (**Fig. 4.2C**).

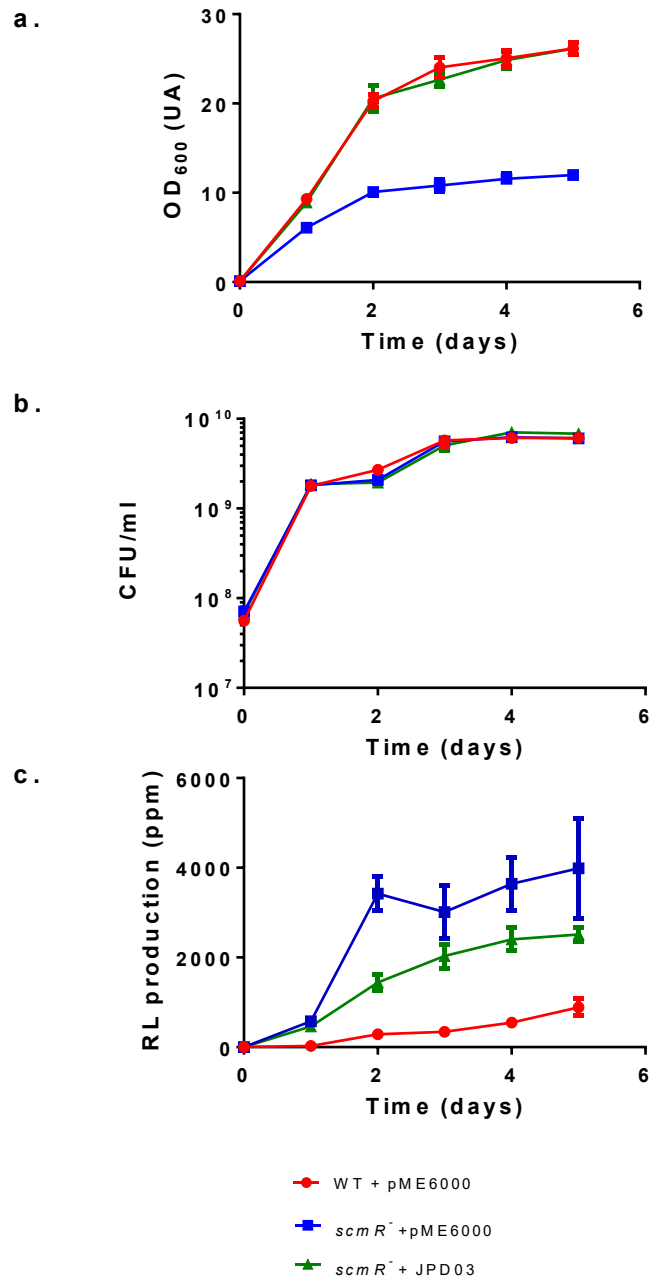


Figure 4.2 : Rhamnolipid production and growth assessment of the *scmR* mutant ED1023, the complemented mutant and the wild type strain E264.

(A) OD₆₀₀ measurements (B) CFU/mL measurements and (C) rhamnolipid production using LC/MS. The values are means ± standard deviations (error bars) for three replicates.

4.5.3 Transcription of both *rhl* operons is augmented in a *scmR*- mutant

We next investigated why rhamnolipid production is increased in a *scmR*- mutant compared to the wild type strain. In *B. thailandensis*, two paralogous *rhl* operons are present and functional, both contributing to total rhamnolipid production (Dubeau *et al.*, 2009). We thus verified the expression of each *rhl* operon in both the WT and the *scmR* mutant ED1023 using transcriptional reporters. While the coding regions of the *rhl* operons are essentially identical, they can be independently analysed because their respective promoter regions are different. Cultures of both the WT and the *scmR*- mutant ED1023 containing the *rhlA1-lacZ* or *rhlA2-lacZ* reporter were performed in NB medium with 2% (v/v) glycerol. **Figure 4.3** shows that the expression of each operon is higher in the *scmR*- background compared to the wild-type, revealing that ScmR acts a repressor of both *rhl* operons in strain E264. Interestingly, this effect was more important for the *rhlA2* operon, for which the transcription was up to 10 times higher than the in wildtype, while the transcription level was up to 4 times higher for the other operon, at 72h of cultivation.

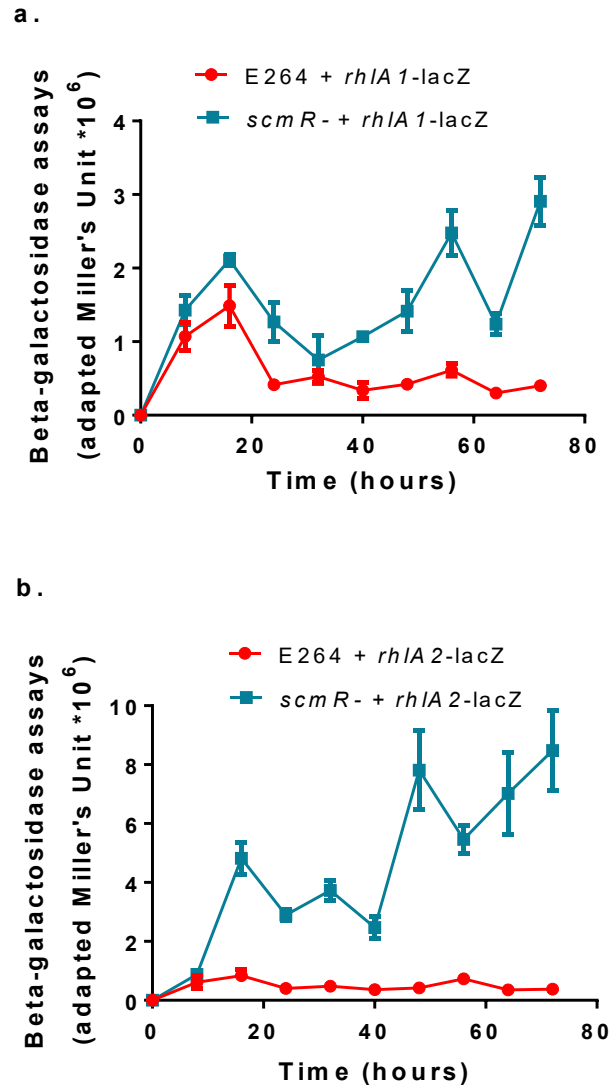


Figure 4.3 : Transcription of both *rhl* operons is increased in the *scmR*- mutant.

β -galactosidase activity was measured using (A) *rhIA1-lacZ* and (B) *rhIA2-lacZ* reporters in both the WT and the *scmR*-ED1023 mutant in NB medium supplemented with 2% glycerol. OD₄₂₀ were normalized by CFU/mL. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates.

4.5.4 ScmR positively influences PHA biosynthesis

B. thailandensis was recently reported as a PHA producer (Funston *et al.*, 2017, Kourmentza *et al.*, 2018). Indeed, we demonstrated that *B. thailandensis* produces important

concentrations of PHAs and that this presence of PHA granules inside the cells is responsible for the unreliability of OD₆₀₀ as a way to estimate growth of *B. thailandensis* (**Section 3**). Judging by the OD₆₀₀ measurements and the CFU counts profiles we observed for both WT and *scmR*- strains (**Fig. 4.2A and B**), and since PHAs are also secondary metabolites, we hypothesized that ScmR could also affect the production of this biopolymer.

In order to verify if differences in PHA production is responsible for affecting the OD₆₀₀ measurements shown in **Figure 4.2A**, we measured PHA biosynthesis with Nile Blue fluorescent staining. PHA production was indeed lower (by about 50%) in the *scmR*- mutant vs the WT (**Fig. 4.4A**). We then confirmed these results by PHA granules visualization using electron microscopy. Indeed, E264 contained an average of nine granules of PHA per cell, whereas the *scmR*- mutant contained much fewer (an average of four granules) (**Figs. 4.4B and 4.4C**). Also, after shape comparison and cell length measuring, WT cells were 1.4 fold larger than mutant cells. These results show that ScmR impacts positively the production of PHAs in *B. thailandensis* and that PHA production affects the cellular physiology. Accordingly, complementation of the *scmR*-mutant with a plasmid-borne *scmR* gene fixed the OD₆₀₀ difference we observed in figure **4.2A**) and restored the WT production of PHAs (**Figs. 4.4A and 4.4D**).

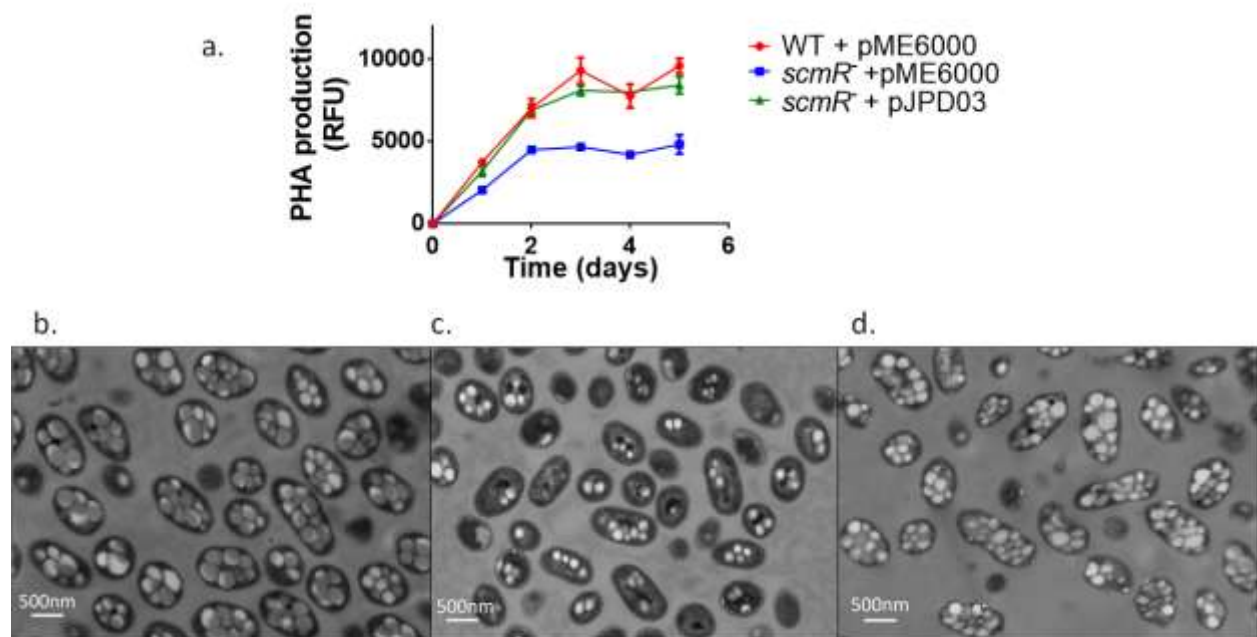


Figure 4.4: ScmR negatively affects PHA biosynthesis.

(A) PHA production was measured using Nile Blue staining. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates. (B),(C) and (D) represent TEM images of E264, the *scmR*- mutant and the complemented *scmR*-mutant, respectively at a magnification of 10,000X.

4.6 Discussion and conclusion

The non-pathogenic bacterium *B. thailandensis* is a promising alternative for the production of rhamnolipids (Dubeau *et al.*, 2009, Funston *et al.*, 2016, Irorere *et al.*, 2018, Kourmentza *et al.*, 2018). However, current yields remain low. As a first step in a program to improve rhamnolipid titers by the prototypic strain E264, we generated and screened a transposants collection obtained by random mutagenesis to identify mutants showing increased rhamnolipid production. In the present study, we focus on the best producer we obtained, M63, that we identified as a *scmR* mutant.

In various microorganisms, PHAs and glycolipids are concomitantly studied because they both possess a hydrophobic moiety composed by fatty acids chains, indicating that they use a common pathway to supply those intermediates. For instance, in *P. aeruginosa*, both PHAs and rhamnolipids share the same pool of *R*-3-hydroxyalkanoate precursors provided by the β -oxydation pathway (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). In contrast, *de novo* fatty acid pathway was recently identified as providing the lipid precursors for rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis* (Irorere *et al.*, 2018) and a competition between rhamnolipid and PHA production was even suggested (Funston *et al.*, 2017). Combined with the proposed role of ScmR in secondary metabolism, we decided to also study the effect of this regulator on PHA production.

Since rhamnolipids and PHAs are generally considered as a secondary metabolites (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010), we expected that the biosynthesis would mostly take place during the stationary phase (Gokulan *et al.*, 2014), due to a repression of the biosynthesis genes at the beginning of the culture (Běhal, 1986). However, previous studies (Dubeau *et al.*, 2009, Kourmentza *et al.*, 2018) already demonstrated that rhamnolipids were produced during logarithmic phase of growth by *B. thailandensis*. We confirmed this observation in our conditions: we noticed that rhamnolipid production actually followed bacterial growth and production in the *scmR*- mutant was also affected early during growth.

In *B. thailandensis*, global transcription of the *rhl* genes was previously described (Funston *et al.*, 2016). However, that study was performed using qRT-PCR on coding sequences, thus

without taking into consideration that two identical *rhl* operons are present in *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009). Both operons distinctly contribute to the total rhamnolipid production. Indeed, a mutation in either *rhIA1* or *rhIA2* causes a decrease but not an abolition of rhamnolipid biosynthesis. Hence, we previously reported that the *rhIA2* operon is responsible for a larger part of total rhamnolipid production since the *rhIA1*- mutant produces more rhamnolipids than the *rhIA2*- mutant (Dubeau *et al.*, 2009). This suggests that both *rhl* operons are differently regulated. Indeed, we found here that the transcription of both *rhl* operons was differently increased in the *scmR*- mutant, at least partially explaining how ScmR acts a repressor of rhamnolipid biosynthesis. However, the effect on *rhIA2* was more important than on *rhIA1* showing again that the regulation of both operons is different. Further studies are needed to clearly understand the regulation of each operon. Whether or not the regulation of ScmR on each of the *rhl* operons is direct has yet to be confirmed.

PHA production is not well documented in *B. thailandensis*. Only few recent studies reported the production of PHAs in this bacterial species. One of them revealed the potential of PHAs production of this strain (Funston *et al.*, 2017). Another one described PHAs production during growth on used cook oil-containing medium (Kourmentza *et al.*, 2018), where the PHA biosynthesis occurred during the logarithmic phase. In several bacteria, excess carbon availability promotes PHA production when nutritional elements such as N, P, S, O, or Mg are limiting (Anderson *et al.*, 1990b). However, it seems that *B. thailandensis* belongs to the group of growth-associated PHA producers, meaning a limitation of an essential nutrient is not necessary for the induction of the PHA biosynthesis (Kourmentza *et al.*, 2018). Other *Burkholderia* species were studied for their potential in PHAs production, such as *B. xenovorans*, *B. sacchari* or *B. cepacia* (Kucera *et al.*, 2017, Urtuvia *et al.*, 2014), so it is consistent that *B. thailandensis* is also a good producer. However, similarly to the rhamnolipid biosynthesis, mechanisms related to the regulation of the PHA production are not known in *B. thailandensis*. Our finding of ScmR regulation of PHA biosynthesis is thus interesting for future investigations on the potential of *B. thailandensis* as a PHA producer.

The implication of the ScmR transcriptional regulator on secondary metabolism regulation was recently described in *B. thailandensis*, where it was shown to act as an important repressor of secondary metabolism (Mao *et al.*, 2017). Our data show that ScmR also regulates the production of rhamnolipids and PHA while neither *rhl* nor *pha* biosynthesis genes were found in the transcriptomic study performed on the *scmR*- mutant (Mao *et al.*, 2017). This not surprising since rhamnolipid production is very low in LB medium, which was used in that study. We noted

that LB medium is not appropriate for rhamnolipid biosynthesis compared to NB medium complemented with 2% glycerol we are using ((Dubeau *et al.*, 2009) and unpublished). While Mao *et al.* (2017) characterized the ScmR regulon and its involvement during the stationary phase (Mao *et al.*, 2017), we revealed that this regulator is already active during the logarithmic phase. Interestingly, here we found that in the WT, both metabolites were synthesized during growth but only the concentration of PHAs kept augmenting when stationary phase was reached. In contrast, when *B. thailandensis* was cultivated on used cooking oil, the rhamnolipid biosynthesis continued after the stationary phase was reached, while the PHA production decreased (Kourmentza *et al.*, 2018), suggesting a tight regulation of these two related metabolites that will require further investigations.

The slow-down in rhamnolipid production we observed under our conditions could be because of changes in nutrient availability, in pH, or in dissolved oxygen concentration. For instance, rhamnose unavailability would explain why the rhamnolipid production was reduced while PHAs kept being synthesized using the lipid precursors. Moreover, in *P. aeruginosa*, dissolved oxygen concentration has a crucial effect on rhamnolipid production (Bazsefidpar *et al.*, 2019, Feng Zhao *et al.*, 2018). The pH was also reported to impact the rhamnolipid production in *P. aeruginosa* (Shan-Yu Chen *et al.*, 2007, Lingqing Zhu *et al.*, 2012). In cultures in NB medium with 2% glycerol of *B. thailandensis*, the pH increased at the log phase and then decreased at the stationary phase (**Additional file 1**). Oxalate production, encoded by the *obc1* gene, is involved into the pH decrease observed in cultures of *B. thailandensis* (Goo *et al.*, 2012). In cultures of the *scmR*- mutant, pH remained higher than in cultures of the WT and this difference could be responsible for the slowing in rhamnolipid production. To verify this hypothesis, we measured rhamnolipid production in cultures of an *obc1* mutant, unable to produce d-oxalate, and wild type E264 strain. Rhamnolipid production was not affected in this mutant, suggesting that pH increase is not involved in the slow-down of rhamnolipid production (**Additional file 1**).

In other species, production of metabolites such as rhamnolipids and PHAs are promoted when some nutrients are limiting. Among them, are phosphate, nitrogen or oxygen (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Optimized medium composition will require further investigation to identify nutritional factors affecting rhamnolipid production in *B. thailandensis*. Clearly, present data indicate that nutritional and regulatory factors controlling rhamnolipid production in *Burkholderia* species are radically different than those seen in *P. aeruginosa* (Irorere *et al.*, 2018, Kourmentza *et al.*, 2018, Nickzad *et al.*, 2016, Nickzad *et al.*, 2018).

The first aim of this work was to identify genes involved in the regulation of rhamnolipid biosynthesis and to study the impact of these genes on the expression of the two *rhl*-operons. We found that ScmR acts as a repressor of rhamnolipid production. In addition, we demonstrated that ScmR was also involved into the PHAs biosynthesis, acting as an activator.

4.7 Supplementary data S1

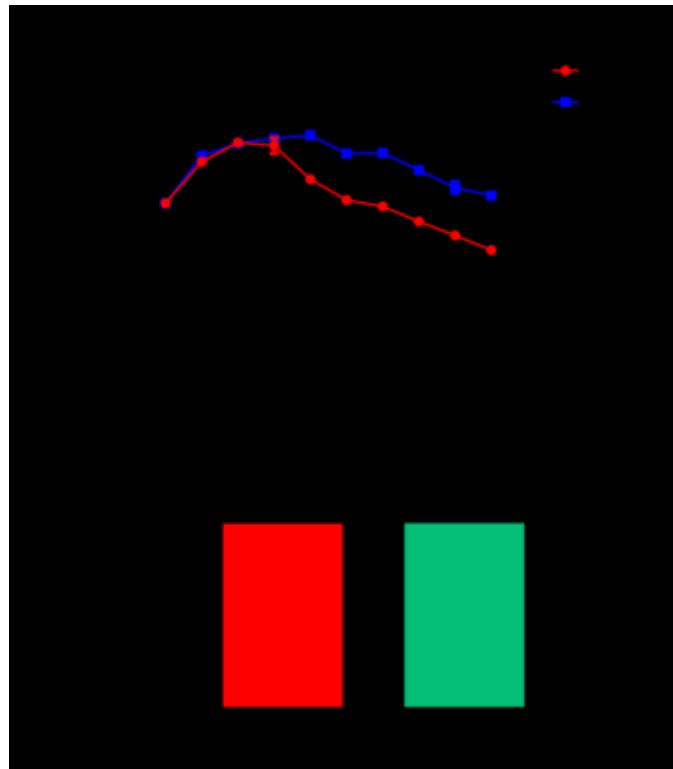


Figure 4.5: Additional file 1: Effect of pH on rhamnolipid biosynthesis.

pH was monitored in cultures of the *scmR*- mutant and the WT strain in NB medium supplemented with 2% glycerol at 30°C. (A). Rhamnolipid concentrations were measured in cultures of the *ocb1*- mutant and the WT strain. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures). Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

4.8 Funding informations

This work was supported by Discovery grant award number RGPIN-2015-03931 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

4.9 Acknowledgements

Thanks to Arnaldo Nakamura for TEM images and Jean-Philippe Dumais for pJPD03 construction.

4.10 Présentation des résultats additionnels de l'article

4.10.1 Bilan des mutations impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides

La sélection phénotypique réalisée au sein de la population générée par mutagenèse aléatoire a permis de sélectionner 8 mutants intéressants. En effet la surface couverte par le halo correspondant à la zone de diffusion dans la gélose par les rhamnolipides était significativement différente pour ces 8 mutants comparativement à la souche sauvage E264 (**Fig 4.6A**). Après quantification des rhamnolipides en milieu liquide par LC/MS, cinq mutants ont révélé un potentiel intéressant, du fait de leur phénotype surproducteur pour les mutants M36, M63, M148 et M171, soit sous-producteur pour le mutant M125.

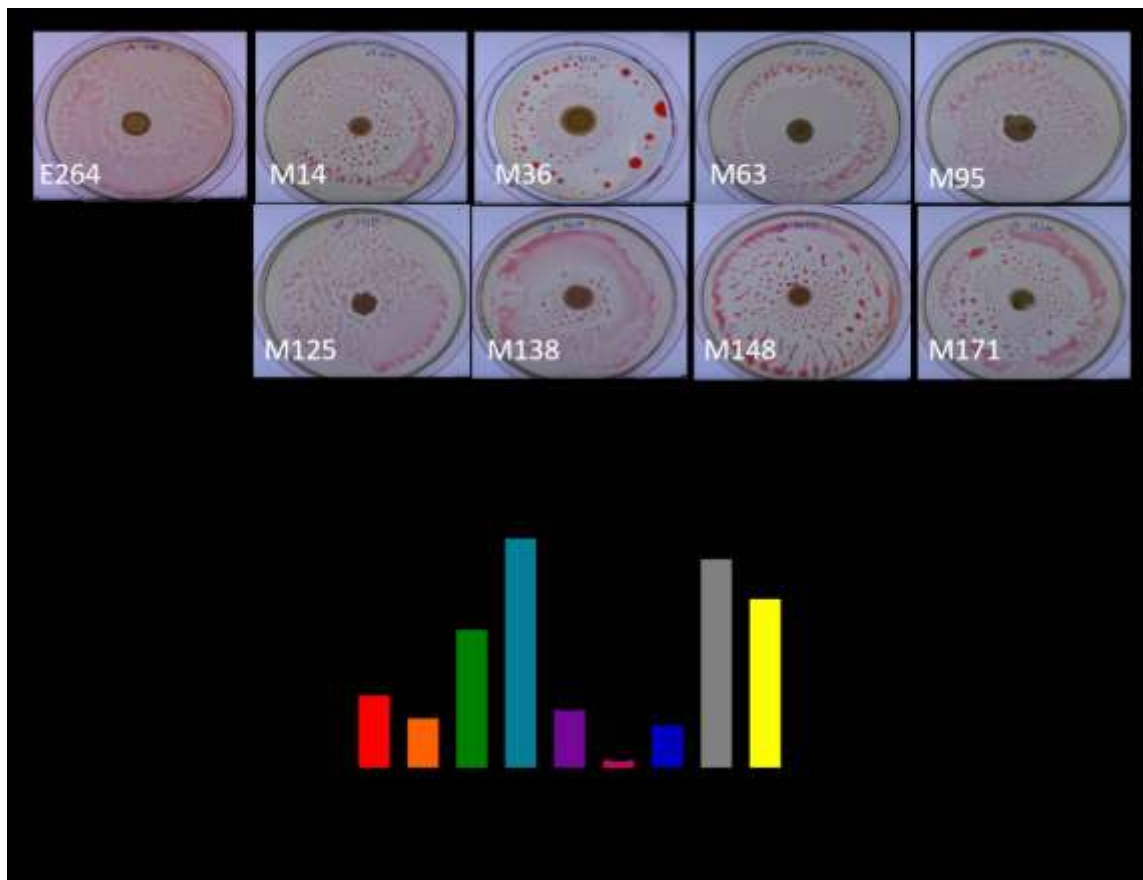


Figure 4.6: La mutagenèse aléatoire a identifié différents mutants de *B. thailandensis* E264 dont la production de rhamnolipides est impactée.

(A) Sélection phénotypique par vaporisation d'huile, (B) Quantification des rhamnolipides après 5 jours de culture en milieu NB + 4% glycerol. Les barres d'erreur représentent la déviation standard à la moyenne ($n = 3$ cultures indépendantes). Les données ont été analysées par un test ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ($****p < 0.0001$).

4.10.1.1 Gènes mis en évidence par le TnSeq

L'ADN génomique des mutants a été extrait et un pool a été réalisé en prenant soin de fournir la même quantité d'ADN génomique pour chaque mutant sélectionné. L'échantillon ainsi préparé a été soumis à une analyse TnSeq en suivant les étapes suivantes :

- Étape 1 : Préparation de la librairie Illumina shotgun incluant un découpage de l'ADN génomique en petits fragments, sélection des fragments de 300-400 pb, réparation des extrémités des fragments et ajout d'un adaptateur Illumina par ligation.

- Étape 2 : PCR avec une amorce spécifique à l'adaptateur Illumina et une amorce spécifique à l'insert. Un tag est ajouté en 5' des amorces.
- Étape 3 : Indexation (barcoding) des produits de PCR.
- Étape 4 : Dosage de chaque échantillon, assemblage équimolaire, purification des pools avec les billes AMPure (= librairie MiSeq)
- Étape 5 : contrôle qualité de la librairie.
- Étape 6 : Séquençage MiSeq

A l'issue du séquençage, les données brutes ont été traitées tel que décrit ci bas :

- Retrait de toutes les bases en 3' de la séquence de l'adaptateur utilisé à Génome Québec : GATCGGAAGAGCACAC.
- Retrait des 48 premières bases correspondant à la cassette insérée dans le génome bactérien, en laissant les 4 dernières bases de la cassette: TCAG. Ainsi, les bons reads débutent par TCAG.
- Les reads ont ensuite été classés par ordre alphabétique de façon à pouvoir identifier les clusters de séquences uniques commençant pas TCAG. Pour chaque cluster, une séquence unique a été identifiée.
- Chaque séquence unique a été analysée afin de valider qu'elle est homologue à une région du génome de *B. thailandensis*.

Les résultats générés par la technique de TnSeq nous ont permis d'identifier les différents gènes où les transposons se sont insérés dans les mutants aléatoires sélectionnés (**Tableau 4.3**).

Tableau 4.3 : Identification des sites d'insertion du transposon à partir des séquences uniques obtenues par traitement des données TnSeq.

Séquences uniques	Gène affecté
TCAGCGCCTCGAGCTGATCGAATTCCTCGAGGAGCGCCCGGCAGCCGTCGAGGTAGCGGATGCCCGCTT CCGTCAGCGACAGATTGCGTGTGCGTGCGATGGATGAGACGCGTGTTCAGATGTGTTTCGAGCATCGCGAT CGAACGCGTGACGAGCAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCG	BTH_I1403
TCAGCCCCAGCCGAACCACAGCAGGAGGCTCAGCGCGACGAGGGGCACCGCGCCCCATCGCAGCGC CTCGCCAGGCGGCCGCGCCACGACTTCGGGCGCGCTCGGGCGCACCGCATCGCGCTCGAGCGACACCT GCCGGATGAGCGGCGTCCACAGCTCGCTGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACT	<i>tssm4</i>
TCAGGTGTACGAGAAGCTGAATCCCGTCGTCGACACGCTGCTGCCCGTCGTCGATACGCTCGAACCCG	<i>vgrG-4a</i>

TCGTGCTCACCGAGCTGCCGGTCGTGACACGCTGGAGCCGGTGATGCTCGTGCAGCTGCCCGTCGTG	
ACATCGACGTGCCCGTGATGCTCGTGCAGCTGCCCGTGTTTCGACATCGACA	
TCAGGTACGGATCGCAGAAGAAGGTCGAACTGCCGTTTCGTGCGGGCGTGATGGCGGACCTGTGGGGCG	
ACAACACCGAGCCGCTCGGCCCCGTGAGGATCGCCGCTTCCAGGAGGTCGACGTCGAGAACTTCGACGA	<i>tssb-4</i>
GCGGATGGCGCAGATCGCGCCGTGCTCAGCTATCACGTGAAGAAAGATCGGAAGAGCACAC	
TCAGTGTCGAACGTCTTGCCGCCCGTGGCGTCGGCATAGGCGCCGGCGATGTAAGGCGTTGCAGACCG	
TATACGGACATAGCGGACATGGGAGATCTCCTTGTGTAGGCGAGGGCGCGTGGCGCATTACGCGCGCGG	<i>betB</i>
CGCGAGCAGCAGGTCAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCAC	

Ainsi, nous avons pu déterminer que les gènes suivants jouaient un rôle dans la production des rhamnolipides :

- BTH_II1885, codant pour une protéine du système de sécrétion de type 6 : Tssm-4
- BTH_II1074, codant pour la protéine BetB, impliquée dans la réponse au stress osmotique
- BTH_II1894, codant pour une protéine du système de sécrétion de type 6 : VgrG-4a, aussi connue sous le nom Tssl-4a
- BTH_II1403, codant pour la protéine ScmR, qui a fait l'objet de l'article présenté en **section 3**.
- BTH_II1901, codant pour une protéine du système de sécrétion de type VI : Tss-B4

4.10.1.2 Identification des sites d'insertion dans les mutants aléatoires

Les ADNs génomiques de tous les mutants ayant été mélangés dans un seul échantillon pour le Tnseq, des PCRs ont ensuite été réalisées pour attribuer le site d'insertion du transposon à chaque mutant (**Tableau 4.4**). Ces amorces ont été dessinées pour obtenir un fragment contenant l'extrémité du transposon ainsi qu'une partie du gène dans lequel il s'est inséré, à partir des séquences uniques obtenues. Cependant il aurait également été possible d'utiliser une amorce unique propre à une partie de séquence du transposon, associée à une amorce spécifique du gène dans lequel s'est inséré le transposon.

Tableau 4.4 : Liste des amorces utilisées pour l'identification des mutants aléatoires

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Taille du produit PCR
SM_tnseq_BHT_I1403_fwd	ACGCTACTTGTGTATAAGAGTCAGC	221 pb
SM_tnseq_BHT_I1403_rev	CGAGATCGTGATGTGACTGG	
SM_tnseq_tssm4_fwd	GACGCTACTTGTGTATAAGAGTCAGG	204 pb
SM_tnseq_tssm4_rev	ACGTGTGCTCTTCCGATCTC	
SM_tnseq_vgrG4a_fwd	ATGGAAAACGGGAAAGGTTTC	118pb
SM_tnseq_vgrG4a_rev	GGGTTCGAGCGTATCGAC	
SM_tnseq_tssB4_fwd	TGTATAAGAGTCAGGTACGGATCG	155 pb
SM_tnseq_tssb4_rev	ATCCGCTCGTCAAGTTCT	
SM_tnseq_betB_fwd	GTCAGTGTGAAACGTCTTGC	174 pb
SM_tnseq_betB_rev	GACGTGTGCTCTTCCGATCT	

Grâce à ces amorces, dessinées nous avons pu déterminer quel gène était inactivé dans chacun des mutants aléatoires (**Tableau 4.5**).

Tableau 4.5 : Identification des mutations dans chacun des mutants sélectionnés.

Nom du mutant	Gène dans lequel est inséré le transposon	Phénotype
M36	<i>betB</i>	Sur-producteur
M63	<i>scmR</i>	Sur-producteur
M125	<i>tssm4</i>	Sous-producteur
M148	<i>vgrG-4a</i>	Sur-producteur
M171	<i>tssB4</i>	Sur-producteur

De façon intéressante on note que trois mutants parmi ceux sélectionnés portent des mutations au niveau des gènes appartenant au système de sécrétion de type VI, suggérant que ce système complexe serait impliqué dans la production des rhamnolipides.

4.10.2 BetB, une enzyme impliquée dans la production des rhamnolipides mis en évidence par mutagenèse aléatoire chez *B. thailandensis*

4.10.2.1 Contexte génomique

Le mutant aléatoire M36 produit environ deux fois plus de rhamnolipides que la souche sauvage. L'analyse des résultats de TnSeq, suivie de l'identification du mutant par PCR, a révélé que le transposon est inséré au niveau du locus BTH_II1073, aussi identifié comme le gène *betB*. L'étude du contexte génomique a montré que ce gène est organisé en opéron avec le gène *betA* (BTH_II1072), appartenant au régulon *bet*. Ce régulon comprend aussi le gène *betI* (BTH_II1074). De façon intéressante, on note la proximité immédiate des gènes *rhl* de *B. thailandensis*, puisque seule une région intergénique de 996 paires de bases sépare le régulon *bet* du gène *rhlA1* (BTH_II1075), qui est le premier gène de l'opéron *rhl* (**Fig. 4.7**). *B. thailandensis* possède aussi un homologue du gène *betT* présent chez *E. coli* (ECIAI39_0372). Le pourcentage d'identité avec ce gène est de 83% et correspond au locus BTH_II1109.

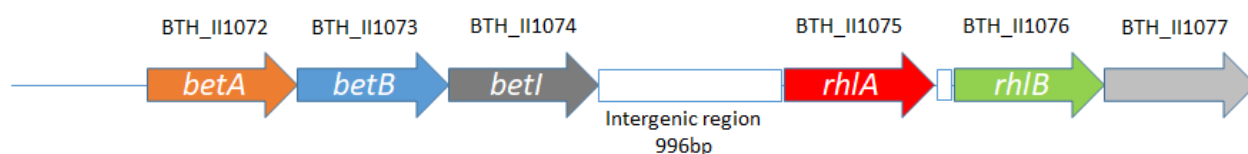


Figure 4.7 : Contexte génomique du gène *betB* chez *B. thailandensis*

4.10.2.2 Fonctionnement du régulon *bet*

Le régulon *bet* permet la synthèse de la glycine bêtaïne. Il s'agit d'une molécule osmoprotectrice obtenue à partir de la choline par l'action de plusieurs enzymes. Le régulon comprend un gène de régulation, *betI*, et trois gènes de structure : *betT*, qui va permettre le transport de la choline, *betA*, qui va catalyser la déshydrogénation de la choline, et enfin *betB*, catalysant l'étape de déshydrogénation de la bêtaïne aldéhyde pour donner la glycine bêtaïne (Lamark *et al.*, 1996, Landfald *et al.*, 1986) (**Fig. 4.8**). Les gènes *bet* sont régulés par différents mécanismes, impliquant l'oxygène, la choline et le stress osmotique. Chez *E. coli*, deux promoteurs indépendants sont responsables de la transcription des gènes *betAB* d'une part et *betT* d'autre part (Lamark *et al.*, 1996). Ces deux promoteurs seraient sous le contrôle du répresseur *betI*. La régulation du choc osmotique passe par le quorum sensing chez différentes

espèces. Par exemple, chez *Vibrio haryevi*, le système LuxR module la transcription de nombreux gènes, incluant des homologues des systèmes Bet et ProU retrouvés chez *E. coli* pour la synthèse et le transport de glycine bétaine, respectivement (van Kessel *et al.*, 2015).

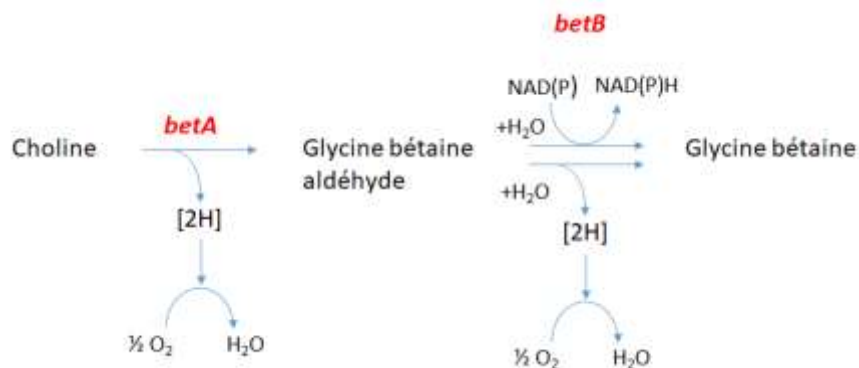


Figure 4.8 : La voie métabolique de la glycine-bétaine

4.10.2.3 Expérience d'activation du régulon *bet* chez la souche sauvage E264

L'opéron *betIAB*, et donc la production de glycine bétaine, sont régulés par la choline, le stress osmotique ou encore l'oxygène. Nous avons réalisé des expériences en tubes pour deux de ces conditions : l'activation par l'ajout de choline ou par stress osmotique.

➤ Essais d'ajout de choline

La choline étant un substrat pour la production de glycine bétaine par le système Bet, nous avons étudié la production des rhamnolipides chez la souche sauvage E264 dans un milieu minimal MSM (non optimisé, tel que décrit dans la **section 7**) complété ou non avec de la choline (1 mM). Nous avons choisi de travailler dans un milieu minimal et défini pour s'assurer que la bactérie ne dispose initialement pas de substrat pour activer la voie de la glycine bétaine. L'expérience a été réalisée en fiole, sous une agitation de 200 rpm à 30°C pendant 4 jours. La production de rhamnolipides a été mesurée en un point final. L'ajout de choline dans le milieu inhibe la production des rhamnolipides (**Figure 4.9**)

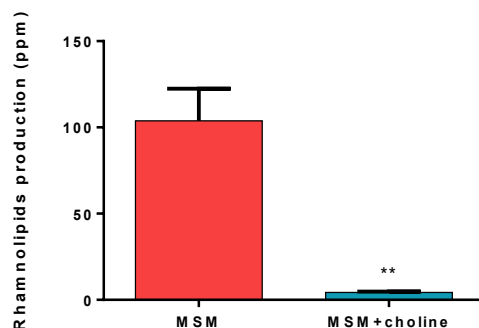


Figure 4.9 : Production des rhamnolipides chez la souche E264 cultivée en milieu minimal supplémenté ou non avec de la choline

➤ Essais de choc osmotique

Nous avons également essayé d'activer la production de la glycine bêtaïne en induisant un choc osmotique chez *B. thailandensis* E264. Pour ce faire, la bactérie a été cultivée dans le milieu MSM à différentes concentrations de NaCl : 0, 0,1, 0,2, 0,35 ou enfin 0,5 M. Les cultures ont été réalisées en tubes contenant 5 mL de milieu. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 4 jours et la production de rhamnolipides et la DO₆₀₀ ont été mesurées à la fin de la culture.

Les données de DO semblent indiquer une meilleure croissance dans les milieux contenant 0.1 et 0.2 M de NaCl, cependant nous n'avons pas encore déterminé à ce stade-ci que la densité optique n'était pas fiable pour mesurer la croissance. En effet, l'augmentation significative que l'on observe dans ces deux conditions pourrait être due à une production considérable de PHA. Cette hypothèse semble cohérente avec la littérature puisqu'il a été démontré chez *Cupriavidus necator* que l'ajout de NaCl jusqu'à une concentration de 9 g/L favorise la production de PHAs (Passanha *et al.*, 2014).

Il faudrait répéter cette expérience en mesurant la production de PHA et en réalisant des dénombrements cellulaire en déterminant les UFC/mL. Malgré tout, les résultats de quantification des rhamnolipides montrent que l'augmentation de la concentration en NaCl a un effet inhibiteur sur la biosynthèse des rhamnolipides (**Fig. 4.10**).

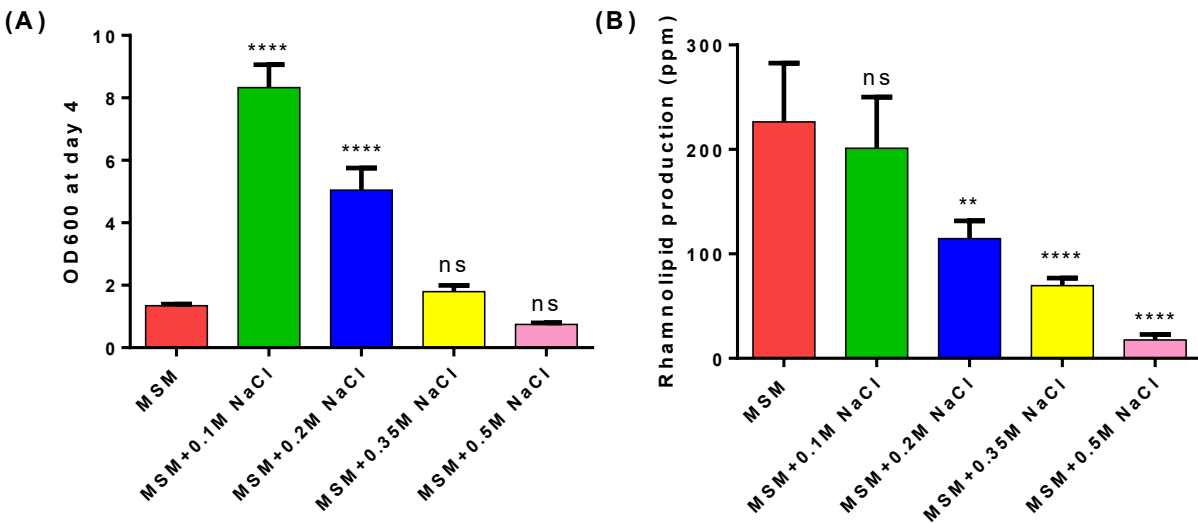


Figure 4.10 : Le choc osmotique inhibe la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis* E264.

Les cultures ont été réalisées en tube contenant 5 mL de milieu MSM pendant 4 jours à 30°C. La DO (A) et la production de rhamnolipides (B) ont été mesurées au jour 4, constituant un point final. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

- Suivi de la transcription des opérons *rhlA1* et *rhlA2* chez la souche E264 dans des conditions d'induction du régulon Bet

Afin de démontrer l'implication de la glycine bêtaïne sur la production des rhamnolipides, nous avons réalisé des cultures en milieu minimal dans des conditions favorisant la synthèse de glycine bêtaïne, à savoir l'ajout de choline ou de NaCl (0,5 M). Des échantillons ont été prélevés chaque jour et des dosages de β -galactosidase ont été réalisés afin d'évaluer la transcription des opérons *rhlA1* et *rhlA2* (**Figure 4.11**). L'hypothèse ici serait que la glycine bêtaïne produite à partir par exemple de la choline ou lors d'un choc osmotique inhibe la production des rhamnolipides comme en témoigne l'expression des deux opérons *rhl* chez la souche sauvage. L'étude de la transcription des gènes *rhlA1* et *rhlA2* dans un mutant *betB*- permettrait de confirmer ce qui est avancé ici.

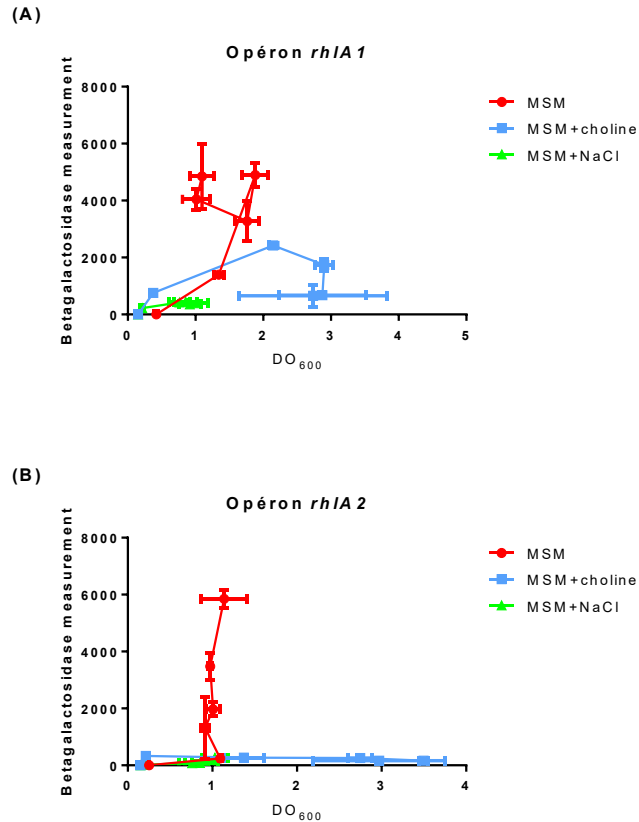


Figure 4.11: Expression des opérons *rhl* chez la souche sauvage en condition favorable à la production de glycine bétaine

Des cultures ont été réalisées à 30°C sous une agitation 200 rpm en milieu MSM supplémenté ou non avec de la choline ou du NaCl. Les essais ont été menés pour suivre l'expression de l'opéron 1 (A) et de l'opéron 2 (B). Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=3 cultures indépendantes)

Ces expériences étant préliminaires il sera important de les répéter. De plus, la normalisation des unités de Miller a été réalisée par les valeurs de densité optique, or j'ai découvert par la suite que ces valeurs ne sont pas le reflet de la croissance bactérienne (**Section 3**). Une normalisation par le compte de bactéries vivante sera donc plus appropriée.

L'inactivation du gène *betB* prévient la formation de glycine bétaine. Or, dans certains microorganismes, un niveau intracellulaire de glycine bétaine est maintenu, en prévision d'un potentiel choc osmotique (Caldas *et al.*, 1999, Nock *et al.*, 2016). Ainsi, chez la souche sauvage, le maintien d'un pool de glycine bétaine pourrait réprimer la production des rhamnolipides et de ce fait la mutation de BetB lèverait l'inhibition de l'expression des gènes *rhl* puisque la glycine bétaine ne serait pas produite.

4.10.2.4 Suivi de densité optique à 600nm

Le profil de densité optique à 600nm du mutant *betB*- a été obtenu pendant des cultures en milieu NB + 2% glycérol de six jours, à 30°C sous une agitation de 200 rpm (**Figure 4.12**). Comme démontré à la **Section 3**, cette mesure n'est finalement pas le reflet de la croissance mais pourrait être un indicateur de la production de PHAs. Si tel est le cas les résultats préliminaires ci-dessous montreraient que la production des PHAs n'est pas diminuée dans le mutant *betB*, comme c'était le cas dans le mutant *scmR*-.

Il faudrait bien évidemment répéter cette expérience non seulement en quantifiant la biosynthèse de PHAs mais également en réalisant des dénombrements cellulaires. Par ailleurs les mutants des autres gènes du régulon *bet* pourront aussi être étudiés puisqu'ils ont été commandés dans la banque de mutants de *B. thailandensis* (Gallagher et al., 2013).

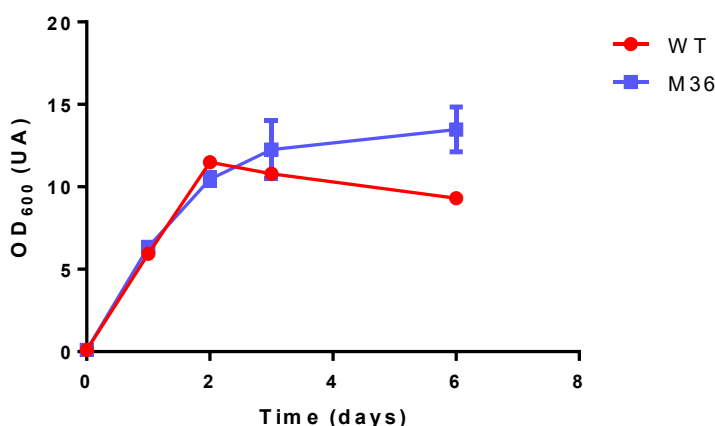


Figure 4.12 : Suivi de la DO_{600} pendant 6 jours chez le mutant *betB* (M36) et la souche sauvage (WT)

Les cultures ont été réalisées en milieu NB + 2% glycérol de six jours, à 30°C sous une agitation de 200 rpm. Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=3 cultures indépendantes).

4.10.3 Le système de sécrétion de type VI

Les résultats de la mutagenèse aléatoire ont montré que trois gènes appartenant au système de sécrétion de type VI sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides.

Le système de sécrétion de type VI est présent dans la plupart des bactéries à Gram négatif et est généralement employé pour compétitionner avec les autres micro-organismes (Ho et al., 2014).

Les systèmes de sécrétion de type VI sont constitués d'au moins 13 protéines contribuant à la machinerie nécessaire à la sécrétion. En effet, l'appareil de sécrétion présente une structure particulière, semblable à un bactériophage retourné (Kanamaru. 2009). Cette morphologie s'explique du fait que les deux protéines majeures appartenant à l'appareil de sécrétion, Hcp et VgrG, présentent des homologies avec les composants de certains phages (Leiman *et al.*, 2009). Hcp forme le tube de sécrétion alors que VgrG constituerait un outil de perforation membranaire (Kapitein *et al.*, 2013). Chez *P. aeruginosa*, deux protéines TssB et TssA vont former un fourreau autour du tube Hcp afin de constituer une unité contractile visant à éjecter le complexe Hcp-VgrG hors de la bactérie pour aller se fixer à la membrane de la cellule cible (Basler *et al.*, 2012).

On recense chez *B. thailandensis* cinq systèmes de sécrétion de type VI, contrairement à *B. pseudomallei* qui possède un large et complexe éventail de systèmes de sécrétion pour des protéines spécifiques (Schell *et al.*, 2007). La fonction de ces cinq systèmes n'a pas été définie. Par exemple, le système 1 serait impliqué dans la croissance de *B. thailandensis* en présence de certaines bactéries, alors que le système 5 jouerait un rôle dans la virulence dans les modèles d'infection murine (Schwarz *et al.*, 2010). Malheureusement, le rôle des trois autres systèmes de sécrétion de type VI n'est pas encore élucidé bien que des données phylogénétiques suggèrent qu'ils soient impliqués dans les interactions inter-bactériennes (Schwarz *et al.*, 2010).

Les trois gènes mis en évidence par la mutagenèse aléatoire sont retrouvés dans le quatrième système de sécrétion de type VI (**Figure 4.13**), nommé T6SS-4, selon la nomenclature des *Burkholderia* proposée par Shalom *et al* (Shalom *et al.*, 2007).

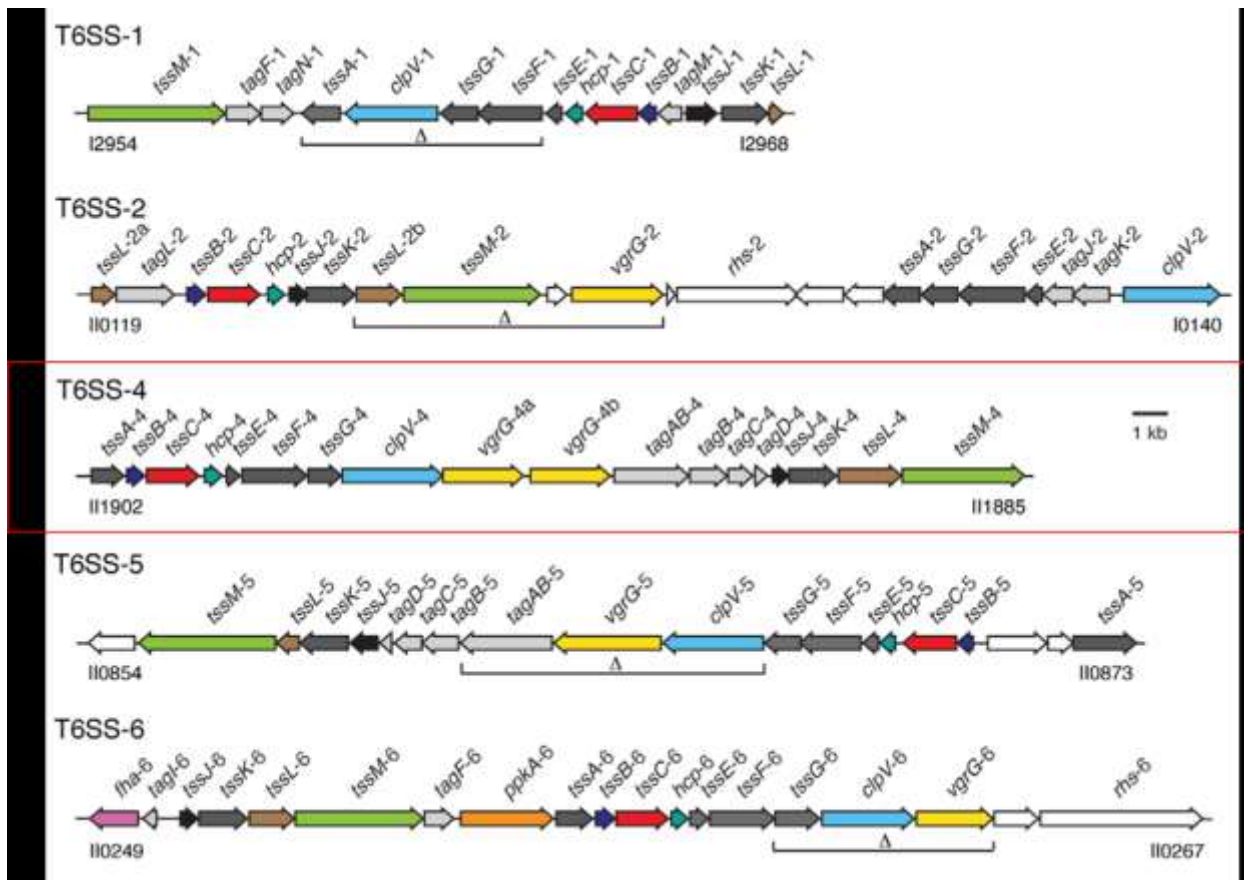


Figure 4.13 : Nomenclature des différents systèmes de sécrétion de type VI chez *B. thailandensis*

(adapté de (Schwarz *et al.*, 2010)

Par ailleurs, une étude a démontré que les rhamnolipides sont impliqués dans la lyse des zoospores. En effet, le modèle proposé par les auteurs est que les rhamnolipides s'intercaleraient dans la membrane des zoospores, déstabilisant la bicouche phospholipidique et entraînant la lyse du zoospore (Stanghellini *et al.*, 1997). Une hypothèse ici serait que les rhamnolipides empruntent le T6SS-4 pour participer à la compétition entre micro-organismes. De plus, le système de sécrétion de type VI serait utilisé par *Burkholderia cenocepacia* dans le cadre de la compétition bactérienne (Spiewak *et al.*, 2019), suggérant que le même type de mécanismes pourrait avoir lieu chez *B. thailandensis*.

Le T6SS-4 a déjà été étudié chez *B. thailandensis*. En effet deux études démontrent que ce système de sécrétion jouerait également un rôle dans l'acquisition de métaux tels que le manganèse ou encore le zinc (Si *et al.*, 2017a, Si *et al.*, 2017b). De façon intéressante, le manganèse est retrouvé dans la solution d'éléments trace qui a été utilisée lors de l'optimisation

du milieu de culture (**Section 8.3.3**). En effet, dans ce chapitre, il a été mis en évidence que la présence d'éléments trace favorisait la production des rhamnolipides. Cependant, le rôle indépendant de chacun des éléments trace n'a pas été testé, aussi il n'est pas possible de conclure directement sur l'impact du manganèse sur la production des rhamnolipides. Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse que l'inactivation des gènes du T6SS-4 pourraient altérer son efficacité quant à l'acquisition de manganèse ou de zinc, et que ces deux éléments pourraient jouer un rôle dans la biosynthèse des rhamnolipides.

4.11 Conclusions générales sur l'article 2

La méthode de mutagenèse suivie du criblage des colonies en milieux solide a permis par après d'identifier par TnSeq plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la production des rhamnolipides. En effet, nous avons choisi d'investiguer plus en détail le régulateur ScmR étant donné que son inactivation permettait la meilleure production de rhamnolipides par rapport aux autres mutants isolés. Cependant, d'autres gènes se sont révélés intéressants mais n'ont donné lieu qu'à des études préliminaires encourageantes. En effet, nous avons mis en évidence deux systèmes régulant la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*, à savoir le régulon Bet et le système de sécrétion de type VI.

Les expériences menées sur les effets de la choline et du choc osmotique sur la souche E264 ont été réalisées avant que nous ne découvriions que *B. thailandensis* produisait des PHAs en grande quantité, biaisant donc les mesures de densité optique pour le suivi de croissance. Il serait donc judicieux de répéter ces expériences afin de vérifier que les conditions testées n'affectent pas la croissance en comptant les UFC.

Concernant les mutations dans le système de sécrétion de type VI, une étude des mutants des gènes codant pour toute la structure pourrait être envisagée.

5 . PRESENTATION DE L'ARTICLE 3

Implementation of a directed evolution strategy for improved production of the microbial surfactant rhamnolipid

Mise en place d'une stratégie d'évolution dirigée pour une production augmentée de rhamnolipides.

Sarah Martinez, David N. Bernard and Eric Déziel*

INRS - Armand-Frappier Santé Biotechnologie

*Corresponding author: INRS - Armand-Frappier Santé Biotechnologie

531, Boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

e-mail: eric.deziel@iaf.inrs.ca

Biotechnology Advances : soumission en cours

Contribution des auteurs :

SM : planification du design expérimental, réalisation des expériences et des analyses des résultats, rédaction du manuscrit

DB : Réalisation des modélisations de structures protéiques

ED : planification du design expérimental, analyse des résultats, rédaction du manuscrit

Les travaux ayant donné matière au premier article de cette thèse ont mis en œuvre une méthode utilisée de façon classique pour générer des mutants : la mutagenèse aléatoire. Le criblage suivant la réalisation de la mutagenèse aléatoire est un travail long et laborieux, puisqu'il s'agit de sélectionner, de façon spécifique, des mutants présentant un caractère d'intérêt, au sein d'une population. Le phénotype ciblé pour notre criblage était une surproduction de rhamnolipides. 50000 colonies devraient être criblées pour pouvoir couvrir la totalité du génome d'un point de vue statistique. Moins traditionnelle, l'évolution dirigée représente une alternative à la mutagenèse aléatoire, qui, en plus d'être chronophage, présente l'inconvénient de générer des organismes génétiquement modifiés, de plus en plus évités à l'échelle industrielle. L'évolution dirigée, reposant sur le principe de sélection naturelle, est une méthodologie dans laquelle une contrainte est appliquée à des populations de façon à favoriser l'émergence d'évoluants portant les caractéristiques souhaitées.

5.1 Abstract

Biosurfactants represent a valid and sustainable substitute for synthetic surfactants. Rhamnolipids are produced by some bacteria, including *Burkholderia thailandensis*. Current bioprocesses for rhamnolipid production are not efficient enough and yields remain low. Identifying regulatory factors could help increase the production of this biosurfactant. In *B. thailandensis*, rhamnolipid biosynthesis contributes to the swarming motility, a social behaviour during which wetting agent reduce the tension between the substrate and the bacterial cell, allowing cells to colonize the environment using their flagella. Under laboratory conditions, swarming is typically seen on agar concentrations above 0.3% and below 1.5%, depending on the bacteria and culture conditions. Based on this observation, we used a directed evolution approach to identify factors regulating rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis*, to improve rhamnolipid productivity. Indeed, we proposed that if the agar concentration was increased, cells would have to produce more rhamnolipids to wet the surface and maintain their swarming phenotype. We performed ten consecutive rounds of cultivation on swarming media at various concentrations of agar in order to generate three independent lineages initiated from a common ancestor strain, *B. thailandensis* E264. We verified the rhamnolipid production of the resulting populations in liquid medium and then we screened each population to identify the best rhamnolipid overproducer evolvents. The genomes of clones from the two best producing population for each lineage were sequenced and compared to the wildtype (WT) genome. We demonstrated here that the adaptive evolution strategy led to an increased rhamnolipid production. We also showed that the higher the agar concentration, the greater was the rhamnolipid production, until the swarming inhibitory agar concentration was reached. Whole genome sequencing results revealed a limited number of mutations in different genes. Interestingly, three of the six sequenced evolvents carry mutations in the *qsmR* gene, coding for an IclR-type transcriptional regulator. Our results indicated that QsmR is a repressor of the transcription of the genes involved in rhamnolipid biosynthesis but also could QsmR be implicated into the rhamnolipid export mechanisms.

5.2 Importance

For the first time, the implementation of a directed evolution led to the enhancement of the rhamnolipid production. This kind of methodology could be applied for other biosurfactant producing micro-organisms.

5.3 Introduction

Surfactants are widely used in several fields, such as pharmaceutical and food industries (Ajay Singh *et al.*, 2007). Typically derived from non-sustainable petrochemical processes, synthetic surfactants are of concern because of their poor biodegradability and significant environmental toxicity. As a consequence, intense investigations are focused on surface-active molecules of biological origin, which represent an interesting and sustainable alternative to synthetic ones. Biosurfactants have many advantages due to their biodegradability, low toxicity and ability to be produced from renewable sources of raw material (Abalos *et al.*, 2001). Identified for the first time in *Pseudomonas aeruginosa* cultures (Jarvis *et al.*, 1949), rhamnolipids are among the best-studied biosurfactants (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Nitschke *et al.*, 2005). However, because of the virulence of *P. aeruginosa*, which is an important opportunistic pathogen, alternatives based on non-pathogenic bacteria are actively sought to develop new industrial processes for rhamnolipid production. We previously identified the capacity of the β -proteobacteria *Burkholderia thailandensis* to also produce rhamnolipids (Dubeau *et al.*, 2009). However, current processes for rhamnolipid production by this bacterium are not efficient, delivering only low yields. This is largely due to lack of knowledge on the factors regulating the biosynthesis of rhamnolipids in *B. thailandensis*.

Beside traditional culture conditions optimization methodologies, identifying regulatory factors could immensely increase the production of this biosurfactant. Approaches based on modulating some factors previously reported to influence rhamnolipid production in another bacterial species is not promising, mainly because most knowledge about rhamnolipid production was obtained from studying *P. aeruginosa*, a significantly different γ -proteobacteria. For instance, in contrast with *P. aeruginosa*, the *rhlA*, *rhlB* and *rhlC* biosynthesis genes are clustered together in *B. thailandensis*, with other genes of still unknown functions (Dubeau *et al.*). Furthermore, *B. thailandensis* carries two *rhl* operons, that are orthologous but differently regulated (**Section 4**). Another notable difference is that quorum sensing positively regulates rhamnolipid biosynthesis in *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010), and also in *Burkholderia glumae* (Nickzad *et al.*, 2015), while recent data indicate that quorum sensing represses rhamnolipid production in *B. thailandensis* (Irorere U *et al.*, 2019). The latter study is maybe not surprising, considering the extremely complex homeostatic regulatory feedback loops provided by the three complete quorum sensing systems functioning in this bacterium (Le Guillouzer 2017).

Random mutagenesis methodologies are frequently used to obtain derived strains with a desired phenotype, and learn more about genetic factors involved in the production of specific

metabolites (Barquist *et al.*, 2013) . Accordingly, we have recently exploited a transposon mutagenesis approach to isolate mutants of *B. thailandensis* expressing increased rhamnolipid production (**Section 4**). Although we were successful in identifying a gene coding for a repressor of rhamnolipid biosynthesis, the transcriptional regulator ScmR (**Section 4**), representing a valid target for improved processes, such an approach remains traditional, labor-intensive, and limited by the availability of a sensitive screening method. An emerging approach is the use of directed evolution, a process by which natural evolution is applied through selective pressure to improve specifically a phenotype of choice, linked to a genomic alteration (Chou *et al.*, 2013). Similarly to *P. aeruginosa*, *B. thailandensis* is able to perform swarming motility (Dubeau *et al.*, 2009), a social behaviour requiring both functional flagella and production of a surface-wetting agent (Kearns, 2010). Swarming bacteria release surfactants that reduce friction between the substrate and the cells, promoting spreading over surfaces (Henrichsen, 1972). Bacteria producing rhamnolipids require this wetting agent to be able to swarm (Kohler *et al.* 2000; Déziel *et al.* 2003; Dubeau *et al.* 2009; Nickzad *et al.* 2015). Based on these characteristics, repeated transfer rounds of *P. aeruginosa* swarming cells drove remarkable parallel evolution towards a hyperswarmer phenotype (Van Ditmarsch *et al.*, 2013). Under laboratory conditions, swarming is typically seen on agar concentrations between 0.3% and 1.5%, depending on the bacteria and culture conditions (Kearns, 2010). We hypothesized that this surfactant-dependant surface behaviour could be used to identify key factors controlling rhamnolipid production. Many studies showed that higher surface hardness has a negative impact on swarming motility (Kamatkar *et al.*, 2011). We proposed that increasing the agar concentration would constrain the cells to produce more rhamnolipids to maintain their swarming phenotype. Therefore, surface hardness would represent a selective pressure promoting rhamnolipid production in *B. thailandensis*.

In this study, we successfully implemented an adaptive evolution strategy in order to select rhamnolipid-overproducing mutants in a bacterial population and then defined which genes are involved in rhamnolipid biosynthesis.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmid used in this study are presented in **Table 5.1**. All strains were stored in 15% glycerol at -80°C and plasmids were stored in -20°C.

Tableau 5.1 : Strains and plasmids used in this study

Strains	Characteristic	Reference
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Wild type strain	(Paul J Brett <i>et al.</i> , 1998)
<i>qsmR-1</i> BT01082	Transposon mutant in BTH_II2865 in <i>B. thailandensis</i> , Tc ^R E264 BTH_2865-126::ISlacZ/hah-Tc	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
<i>qsmR-2</i> BT09539	Transposon mutant in BTH_II2865 in <i>B. thailandensis</i> , Tp ^R E264 <i>qsmR</i> -135::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BTH_II2866 BT02189	Transposon mutant in BTH_II2866 in <i>B. thailandensis</i> E264 BTH_II2866-177::ISlacZ/hah-Tc	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BTH_II2867 BT11163	Transposon mutant in BTH_II2867 in <i>B. thailandensis</i> E264 BTH_II2267-155::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BTH_II2868 mutant BT08158	Transposon mutant in BTH_II2868 in <i>B. thailandensis</i> E264 BTH_II2268-194::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
Plasmids		
pME6000	Broad-host-range cloning vector; Tc ^R	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)
pSM1	<i>qsmR</i> gene inserted in BamHI-HindIII sites in pME6000; Tc ^R	This study
pAH5	<i>lacZ</i> controlled by the promoter region of <i>rhIA1</i> ;Tp ^R	Section 4
pAH8	<i>lacZ</i> controlled by the promoter region of <i>rhIA2</i> ;Tp ^R	Section 4

Tp: trimethoprim; Tc: tetracycline

5.4.2 Media and growth conditions

Strains were routinely grown from -80°C frozen stocks by culturing in tryptic soy broth (TSB) (BD Difco, Mississauga, ON, Canada). For rhamnolipid production, nutrient broth (NB) medium (BD Difco, Mississauga, ON, Canada) supplemented with 2 or 4% (w/v) glycerol was used. Cultures were incubated at 37°C under rotation at 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: 10 µg ml⁻¹ tetracycline (Tc), and 100 µg ml⁻¹ trimethoprim (Tp) for *B. thailandensis* and 15 µg ml⁻¹ tetracycline (Tc), and 100 µg ml⁻¹ trimethoprim (Tp) for *E. coli*.

5.4.3 Directed evolution experiments

Plates were prepared as follows: freshly autoclaved medium consisting of NB supplemented with 0.5% dextrose (Fisher) and different concentrations (0.5%, 1.5% or 2.5%) of Bacto-agar (Difco) was poured into standard Petri dishes and dried under laminar flow for 30 min, according to Lai *et al.* (Lai *et al.*, 2009). Immediately following the drying period, plates were inoculated at their center with 5 µl of bacterial culture at an OD₆₀₀ = 3 and incubated at 30°C for 16 hours. The *B. thailandensis* strain E264 was cultured in 3 mL NB + 4% glycerol medium for overnight cultures. After 16h, the cultures were diluted at OD₆₀₀ = 0.1 in new tubes containing the same medium culture and cultured until the OD₆₀₀ reached 3.0 (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Every 16 h, each colony was completely harvested from the plate and suspended in PBS. OD₆₀₀ was adjusted to 3.0 and new swarming plates were inoculated. This procedure was repeated daily during 10 days. The cell suspensions from each passage were stored in 15% glycerol at -80°C. Parallel passages in liquid media were also performed as controls (**Fig. 5.1**).

Three replicates were performed for every assay and the experiments were performed three times, independently.

Swarming assays were realized as describe before with a 0.5% agar concentration (Lai *et al.*, 2009).

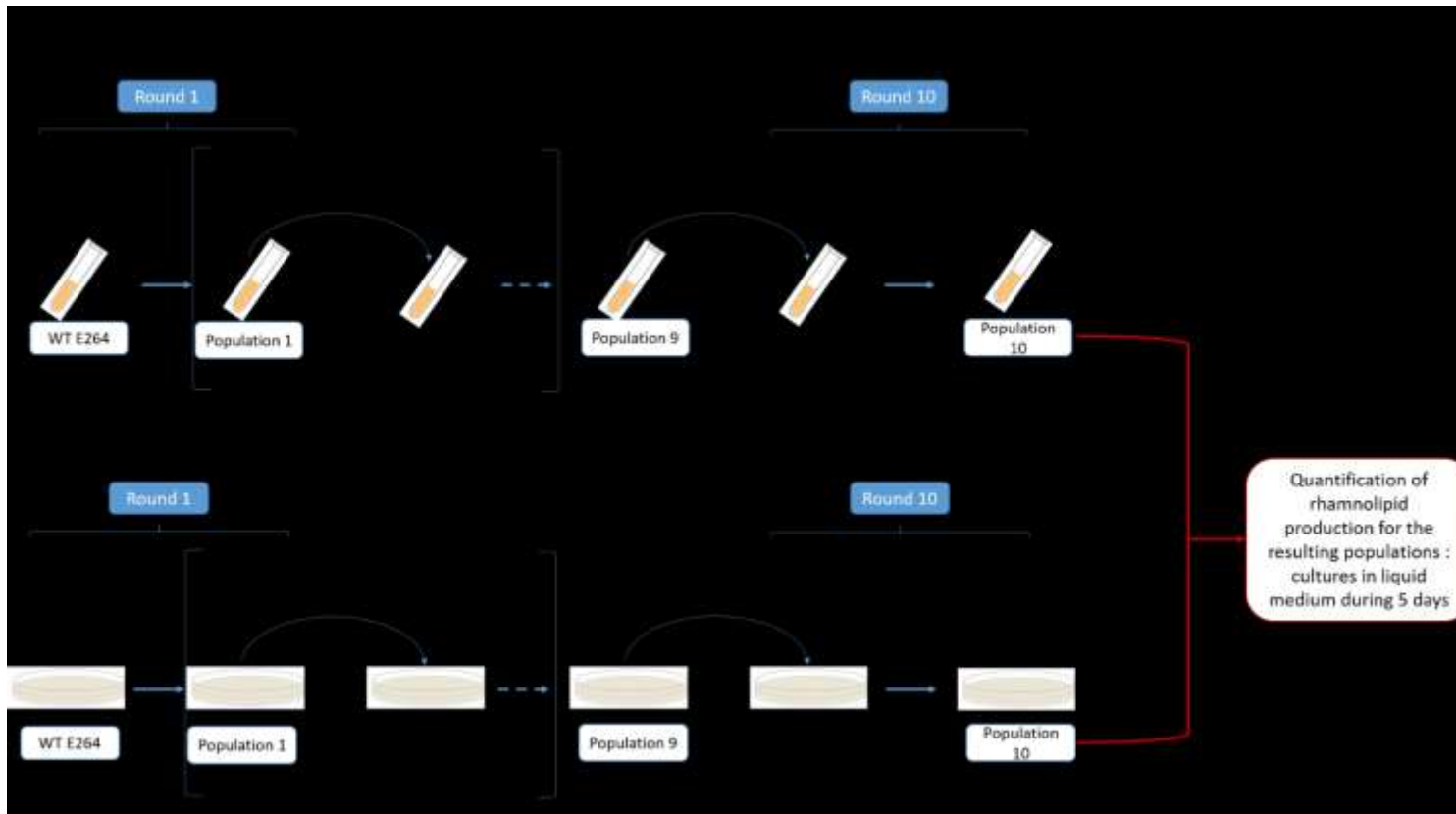


Figure 5.1: Experimental strategy for transfers in liquid or agar containing agar.

Different agar concentrations were tested: 0.5%, corresponding to the standard condition for swarming motility assays, 1.5% and 2.5%. Liquid transfers were performed as control. After the 10 transfers, resulting populations were cultured in liquid media for evaluation of rhamnolipid production.

5.4.4 Rhamnolipid quantification

Rhamnolipid were quantified as previously described (**Section 4.4.7**).

5.4.5 DNA extraction and whole genome sequencing:

Genomic DNA of rhamnolipid-overproducing bacteria was extracted with the Purelink genomic DNA kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Purity controls were confirmed by UV spectrophotometric analyses and DNA quantification was verified on a Corbett Life Science Rotor-Gene 6000 thermal cycler using the Quant-iT™ PicoGreenR dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's protocol. Samples and reference strains were sent to McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Qc, Canada) for whole genome sequencing. Libraries were created and modified using the Illumina Paired-End Sample Prep Kit and sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina, Inc.).

5.4.6 Data analysis

Quality of raw data was assessed, reads were quality trimmed and downstream analysis was carried out using the Galaxy platform (Goecks *et al.*, 2010). Reads were assembled and mapped to the E264 wild type strain reference genome, and SNPs were determined using Lasergene (DNASTAR).

5.4.7 Vector construction

For construction of the *qsmR* complementation plasmid pSM1, the *qsmR* gene (BTH_I2865) was amplified by PCR from *B. thailandensis* E264 genomic DNA using primers Thai-complementation_*qsmR*-F (5'- CGGGGTACCCAAAACGCGCACACTTTTCC -3') and Thai-Complementation_*qsmR*-R (5'- CGCGGATCCTATTTACCGGGCGCGATTCC -3') and cloned inside the BamHI and HindIII sites of the pME6000 vector. The construct was transformed in *E. coli* DH5 α and tetracycline was used for selection. The pSM1 plasmid was transferred in the *qsmR*-mutant (BT01082) by electroporation (1,800 V).

5.4.8 β -galactosidase activity assays

The two reporters pAH5 and pAH8 were independently transferred in the *qsmR* (BT01082) mutant by electroporation (1,800 V). β -galactosidase assays were performed as described by

Miller (JH Miller, 1972), with modification. Normalization of the activity was realized by CFU/mL instead of OD₆₀₀.

5.4.9 RNA extraction

Total RNA of *B. thailandensis* E264 and *qsmR* mutant L2-C1 (mutant from directed evolution) cultures at 24 h, 72 h and 96 h was extracted as previously described (Le Guillouzer *et al.*, 2017).

5.4.10 RT-qPCR assays

cDNA synthesis was performed using the iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories), and amplification was accomplished as described by (Le Guillouzer *et al.*, 2017). The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Tab. 5.2**. Differences in gene expression between *B. thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as statistically significant.

Tableau 5.2: Primers used for qRT-PCR

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5'to 3')	Reference
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F SLG_qRT-PCR_ndh_R	ACCAGGGCGAATTGATCTC GATGACGAGCGTGTCGTATT	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
BTH_I2866	SM_qrtPCR_2866_fwd SM_qrtPCR_2866_rev	CTCGACCTGAAGCGCTATCA GTAGGCGAGATTGAGCTTCG	This study

5.5 Results

5.5.1 Surface tension favors rhamnolipid production of a *B. thailandensis* population

A directed evolution strategy was developed with the aim to obtain evolved mutant clones of *B. thailandensis* E264 producing more rhamnolipids than the parent strain. Three independent lineages initiated from the common ancestor strain E264 were treated to consecutive rounds of cultivation on swarming plates containing various agar concentrations. After ten transfers, rhamnolipid quantification was performed on cultures started from the resulting populations. Results were compared to rhamnolipid production from the ancestral E264 strain and to the control population transferred 10 times in liquid cultures. **Figure 5.2** shows that the control population obtained after 10 passages in liquid media produced the same concentration of rhamnolipids compared to the ancestral WT strain. In contrast, rhamnolipid production was increased from the evolved populations developed on agar plates. The higher the agar concentration, the greater was the rhamnolipid production from the respective evolved populations, until a plateau was reached.

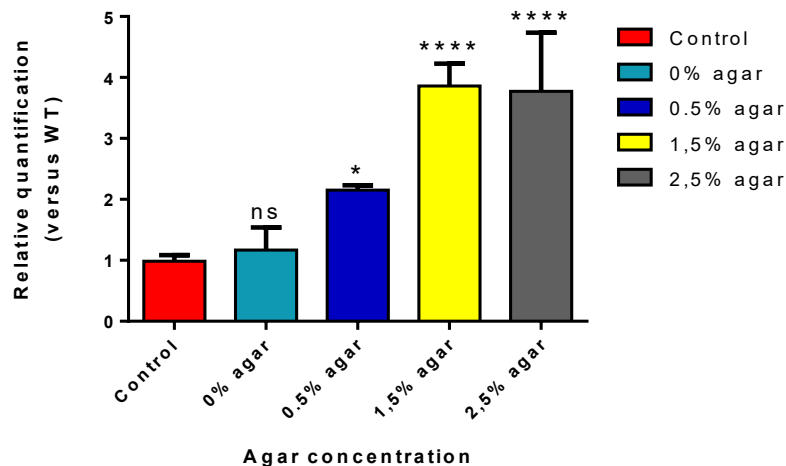


Figure 5.2 : Populations adapted to grow and migrate on plates with higher agar concentrations produce superior concentrations of rhamnolipids.

Wild type E264 strain and resulting evolved populations from the tenth round for each concentration of agar contained in the medium were cultured during 5 days to assess rhamnolipid production. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures, each derived from an independent lineage), Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

From each lineage obtained after 10 rounds in 1.5% agar plates, ten isolated colonies were screened from the evolved population and rhamnolipid production was verified for each clone by LC/MS quantification.

Several clones produced significantly more rhamnolipids than the ancestral WT strain (**Fig. 5.3**).

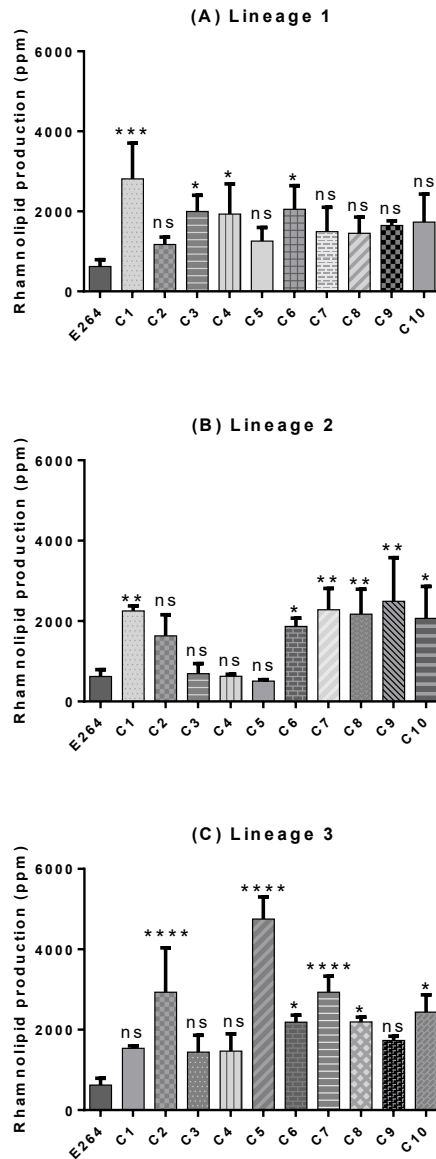


Figure 5.3 : Rhamnolipid production for clones selected from *B. thailandensis* populations evolved on 1.5% agar plates.

(A) lineage 1, (B) lineage 2, (C) lineage 3. Experiments were performed in triplicates. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

For the first lineage (**Fig. 5.3 A**), C1, C3, C4 and C6 produced three times more rhamnolipids than the wild type E264. For the second lineage (**Fig. 5.3 B**), C1, C6, C7, C8, C9 and C10 produced three times more rhamnolipids than the WT. Finally, in lineage 3 (**Fig. 5.3 C**) C2 and C7 produced four times more rhamnolipids than the wild type and C5 seven times more.

5.5.2 Highlighted gene mutations revealed by whole genome sequencing.

From the 30 isolates, we selected two clones per lineage for whole genome sequencing, in order to identify genetic changes linked with the adaptive phenotype, compared with the ancestral WT E264 strain. Interestingly, three of the six sequenced clones carried mutations into the BTH_I2865 locus, coding for an lclR-type transcriptional regulator orthologous to the well-studied QsmR regulator of *B. glumae* (Kim *et al.*, 2007). This regulator was previously described in *B. thailandensis* (Goo *et al.*, 2012, C Majerczyk *et al.*, 2014a) (**Table 5.3**). Sequencing also revealed mutations into the BTH_II0885 locus encoding a putative TetR family transcriptional regulator or into locus BTH_I2820 encoding a predicted dioxygenase. Finally, one of the three mutants carrying a mutation into the *qsmR* gene also harbors a mutation into the BTH_II0864 locus, corresponding to the gene encoding for encoding the CplV-5 ATPase, which forms part of the type VI secretion system.

Tableau 5.3: Mutations found in evolved clones of *B. thailandensis* E264 displaying increased the rhamnolipid production.

Clone	Gene	Mutation type	Function
Lineage 1			
C1	BTH_I2820	deletion	Carotenoid 9,10-9,10 cleavage deoxygenase
C3	BTH_I2820	deletion	Carotenoid 9,10-9,10 cleavage deoxygenase
Lineage 2			
C1	BTH_I2865	SNP*	Transcriptional regulator <i>qsmR</i>
C7	BTH_I2865	SNP	Transcriptional regulator <i>qsmR</i>
Lineage 3			

C5	BTH_I10885	deletion	TetR family transcriptional regulator
C7	BTH_I2865	deletion/insertion	Transcriptional regulator <i>qsmR</i>
	BTH_I10864	Insertion	<i>clpV-5</i>

*SNP = Single Nucleotid Polymorphism

Because of their frequency, we decided to focus on the *qsmR* mutations.

5.5.3 Rhamnolipid production is under the control of the transcriptional regulator QsmR

Sequencing results indicated that three mutants presented one or several mutations in the BTH_I12865 locus, coding for a transcriptional regulator named QsmR. A BTH_I12865 mutant was acquired from the *B. thailandensis* transposon mutant library (Gallagher et al. 2013) and tested for swarming motility and rhamnolipid production. For this *qsmR-1* mutant, a hyperswarmer phenotype was obtained, which was also observed for the three *qsmR* mutants obtained by directed evolution (**Fig. 5.4 A**). Accordingly, rhamnolipid production was higher in cultures of the *qsmR-1* mutant (**Fig. 5.4 B**).

(A)



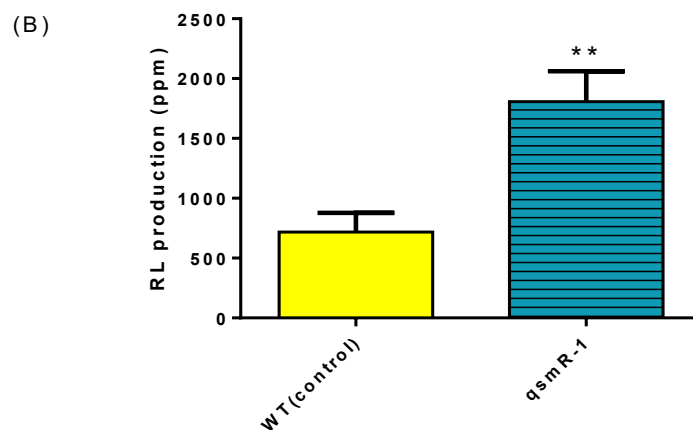


Figure 5.4 : Mutation in *qsmR* leads to a hyperswarmer phenotype and overproduction of rhamnolipids.

(A) Swarming assays were realized with the three *qsmR*- mutants obtained from the directed evolution experiment and the *qsmR*-1 transposon mutant, compared to the wildtype E264 strain. (B) After 5 days of cultivation, rhamnolipids were quantified in cultures of the *qsmR*-1 mutant and wild-type strain E264, confirming increased production by inactivating *qsmR*. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

Rhamnolipids concentrations were restored to WT levels in *qsmR*-1 mutant when complemented by expression of a plasmid-borne *qsmR* gene, confirming our results were caused by the mutations in *qsmR* (data not shown).

5.5.4 QsmR act as a repressor of the *rhl* operons in *B. thailandensis*

B. thailandensis harbors two essentially identical *rhl* operons coding for biosynthetic genes (Dubeau *et al.*, 2009). To understand how *qsmR* is involved in rhamnolipid production, we verified the levels of transcription from the promoters of two *rhl* operons, using *lacZ* reporters. Since production of rhamnolipid is maximal after 3 days (**Section 4**), the bacterial cells were incubated in flasks cultures with a sampling every 8 hours for 72 hours. **Figure 5.5** shows that the expression of each operon was higher in the *qsmR* mutant compared to the WT although the effect was stronger on *rhlA2*.

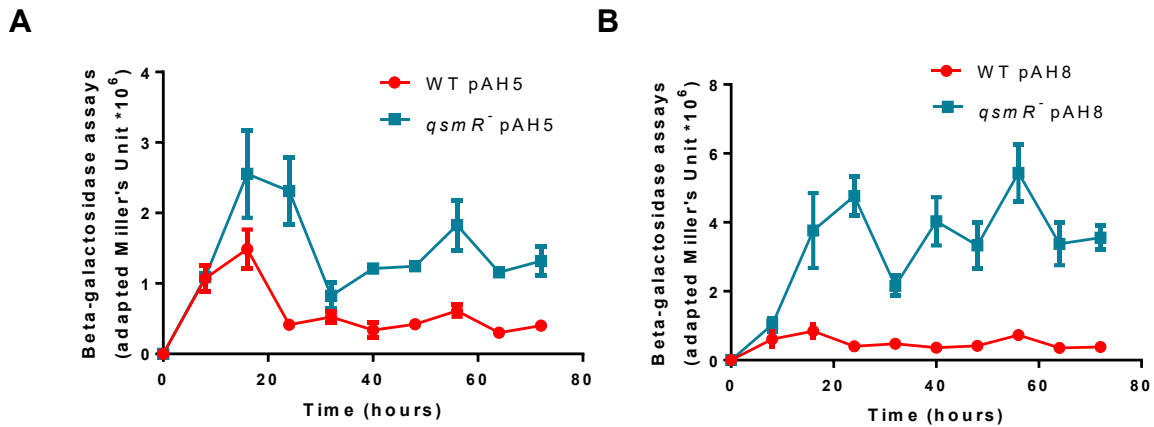


Figure 5.5 : Both *rhl* operons of *B. thailandensis* E264 are upregulated in a *qsmR* mutant.

β -galactosidase assays were performed in samples from cultures in NB medium supplemented with 2% glycerol during 72h for the WT and the *qsmR* mutant strains, carrying one of two reporters for each *rhl* operon. (A) pAH5 (promoter region upstream of BTH_II1075 [*rhlA1*]) and (B) pAH8 (promoter region upstream of BTH_II1881 [*rhlA2*]) in *B. thailandensis* and in *qsmR*-1 mutant kinetics are presented. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates.

5.5.5 QsmR negatively regulates the expression of the neighboring operon *mdtABC*

In *B. thailandensis*, *qsmR* could be part of an operon with three other genes, BTH_I2866, BTH_I2867 and BTH_I2868, together predicted to encode a putative resistance nodulation-division (RND) family efflux pump according to Burkholderia.com. This system presents some homologies with the *mdtABC* system. Indeed, BTH_I2866 presents a 72 % identity with the *mdtA* homolog found in *Ralstonia taiwanensis* (RALTA_RS02645), BTH_I2867 presents 77 % identity with the *mdtB* homolog found in *R. taiwanensis* (RALTA_RS02640) and BTH_I2868 74 % with the *mdtC* homolog in *R. taiwanensis* (RALTA_RS02635). Since rhamnolipid export mechanisms are not documented in any producing bacteria, we investigated whether these genes could be involved in the higher rhamnolipid production. To test that possibility, BTH_I2866 expression was assessed in *qsmR* mutant by RT-qPCR. **Figure 5.6** demonstrates that BTH_I2866 is expressed five times more in the *qsmR* mutant compared to WT, suggesting that QsmR represses the transcription of this operon.

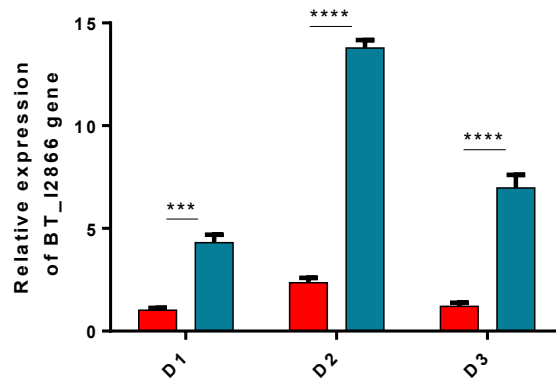


Figure 5.6: Transcription of BTH_I2866 (*mdtA*) is modulated by the QsmR regulator.

Levels of transcription determined by RT-qPCR. D1, D3 and D5 are days of cultivation. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

Next, to verify whether the MdtABC system is involved in rhamnolipid exportation, we compared the rhamnolipid production of *mdtA*-, *mdtB*- and *mdtC*- mutants to the WT. However, rhamnolipid production profiles were found to be similar to the WT for all the strains (Supplementary Figure. S1, **Figure 5.8**).

5.5.6 Prediction of the proteic sequences and structures associated to the *qsmR* gene mutation carrying evolvents and structure analysis

To explore the impact of the identified mutations on the integrity of the QsmR protein, we realized an alignment of the deduced protein sequences. Both mutants from lineage 2 carry the same mutation, corresponding to a single nucleotide polymorphism (SNP) (**Fig. 5.7A**). This mutation is located into a helix-turn-helix motif, a DNA-binding domain of ~60 amino acids typically present in IclR-type regulators (Molina-Henares *et al.*, 2006). The replacement of a leucine by a proline (at the position 77) into an alpha helix would prevent the formation of a hydrogen bond, destabilizing the binding site and thus potentially decreasing the affinity between the regulator and the target DNA (**Fig. 5.7B**). The *qsmR* mutant gene from lineage 3 harbors several mutations, including two nucleotide deletions which shift the reading frame during protein translation, thus causing massive disruption in the effector binding domain (**Fig. 5.7A**), involved in the binding of small effectors or signal molecules (Huang *et al.*, 2012).

(A) Protein sequence alignment for *qsmR* mutants

WT	VKESGKTRTL FRIRLTIDKN LKSSF EKREI SVTTRTNAQA VSREREATTD EITALARGLA	60
L2	VKESGKTRTL FRIRLTIDKN LKSSF EKREI SVTTRTNAQA VSREREATTD EITALARGLA	60
L3	VKESGKTRTL FRIRLTIDKN LKSSF EKREI SVTTRTNAQA VSREREATTD EITALARGLA	60
WT	VLRRIATSDA PVS NRELAEL TGIPKPTVSR ITATLVSAGF LFQLPDSERF VLTASVLELS	120
L2	VLRRIATSDA PVS NRELAEL TGIPKPTVSR ITATLVSAGF LFQLPDSERF VLTASVLELS	120
L3	VLRRIATSDA PVS NRELAEL TGIPKPTVSR ITATLVSAGF LFQLPDSERF VLTASVLELS	120
WT	NGFLRNFDIR ARSRPFLVEL AEKTSLSVHL AVRDR LDMVA IDVIRPRSAV LVTRLETGSR	180
L2	NGFLRNFDIR ARSRPFLVEL AEKTSLSVHL AVRDR LDMVA IDVIRPRSAV LVTRLETGSR	180
L3	NGFLRNFDIR ARSRPFLVEL AEKTSLSVHL AVRDR LDMVA IDVIR TSPRR GSTRGSKRAR	180
WT	M---DIARTA VG----- RAYLAALEDD ARRELIGALQ AAAGDDWPFV VSRLNAAL	229
L2	M---DIARTA VG----- RAYLAALEDD ARRELIGALQ AAAGDDWPFV VSRLNAAL	229
L3	GWTSRARRSA VRTSPRSRTT RAAS-SAHCR PRRATTGRSS --YRG-MPRS PTSRNTATRS	236
WT	IAQHGYAIAI GE----WREE LNAIAAGFVA P-----TGQC YAVNCGGSAH QCTPDFLRSV	280
L2	IAQHGYAIAI GE----WREE LNAIAAGFVA P-----TGQC YAVNCGGSAH QCTPDFLRSV	280
L3	RSANGAKN-M RSRRASSRRR ANATRSIAAA PRSARPTSC ARSRCPR--- -CASASQRSR	291

WT	AVPALRECIA KITREIGAAA WPNRAR----	306
L2	AVPALRECIA KITREIGAAA WPNRAR----	306
L3	A-----RS APPRGRIAPG	304

(B)

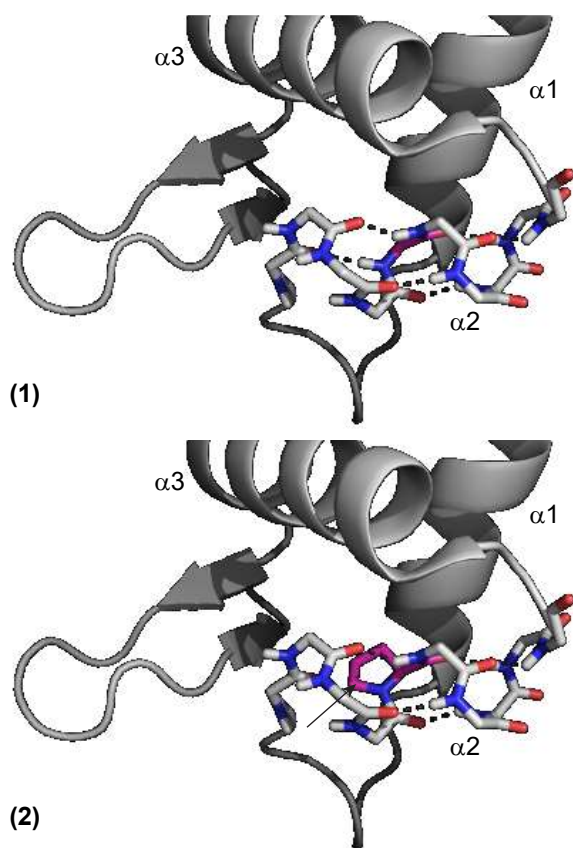


Figure 5.7: Sequence alignment and structural predictions of QsmR mutant proteins compared to the wild type protein.

(A) Sequence alignment between WT QsmR and the two mutants identified by whole-genome sequencing of clones of interest. Sequence alignments were realized using NCBI BLAST. Differences in protein sequences are highlighted in red. (B) Tridimensional cartoon structure of the DNA-binding helix-turn-helix motif of *Brucella abortus* IclR (PDB ID 5whm), the closest homologue of *B. thailandensis* QsmR with a reported crystal structure. The backbone of helix $\alpha 2$ is represented as sticks, hydrogen bonds are depicted as dashed lines, and the mutation site is represented in magenta. (1) shows the WT protein and (2) shows the mutant from lineage 2 L2C1/C7. Introduction of a proline destabilizes helix $\alpha 2$ by removing a hydrogen bond, emphasized by an arrow in (2).

5.5.7 Effect of QsmR on pH in rhamnolipid production culture medium

Goo et al showed that *qsmR* is required for oxalate production (Goo *et al.*, 2012). To verify if rhamnolipid overproduction is indirectly due to an effect of pH change on the expression of *rhl* genes, we monitored the pH during in cultures of both *qsmR* mutant and WT under our distinct culture conditions. pH profiles were similar for both strains (data not shown), confirming that overproduction of rhamnolipids was not related to a pH change but due to another mechanism regulated by QsmR.

5.6 Discussion and conclusion

The aim of this study was to identify genes directing rhamnolipid production, to obtain a higher rhamnolipid-producing bacterium. We implemented a methodology based on directed evolution and identified mutants whose rhamnolipid production was four times more important than the ancestral strain *B. thailandensis* E264. Our hypothesis was based on that swarming motility depends on production of a wetting agent, which is rhamnolipid in the case of *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009). Under laboratory conditions, the agar concentration used to solidify the medium can be critical for swarming motility (0.5%–2%), because a certain level of surface wetness is required for the rapid group movement characteristic of swarming motility (Harshey, 2003). Indeed, in *P. aeruginosa*, it was demonstrated that drying longer or increasing the concentration of agar, adding extra salt or sugar or incorporating viscous agents in the agar matrix can all lead to a decrease in swarming motility, supporting the model that this surface behavior is restricted by the surface tension at the swarm front (Tremblay and Déziel, 2008) (Alexander Yang *et al.*, 2017). The results we obtained support our hypothesis that an augmentation in surface tension *via* restrictive agar concentration constrained the bacteria to synthesize more rhamnolipids to achieve a swarming phenotype. Directed evolution had already been investigated under swarming conditions in *P. aeruginosa* to obtain a hyperswarmer phenotype, which was explained by a specific mutation located into *fleN*, a gene involved in flagellar function (Van Ditmarsch, Boyle *et al.* 2013). A fundamental difference here is that we forced the bacteria to produce more rhamnolipids to break the surface tension by using higher concentrations of agar normally not amenable to swarming motility.

Using a traditional random transposon mutagenesis approach, we have recently identified the ScmR repressor as a target for increased production of rhamnolipids in *B. thailandensis* E264 (**Section 4**). Here, with our experimental strategy, we unveiled new genes involved in rhamnolipid production in *B. thailandensis*. Three out of six mutants from two different lineages we genome

sequenced harbor mutation into the *qsmR*, suggesting that this gene is an important regulator of rhamnolipid production and could be studied more extensively to render rhamnolipid production more efficient *via* metabolic engineering strategies.

The two *qsmR*- mutants from the lineage 2 carried the same mutation, corresponding to a single nucleotide polymorphism located in an alpha helix that might destabilise the total domain structure and decrease the affinity between the regulator and the target DNA. The *qsmR* mutant from the lineage 3 harbored several mutations, both indels and substitutions all located in the effector binding domain. This effector binding domain may recognize a small effector or signal molecule. Disruption in the effector binding domain could affect the protein-ligand liaison and thus disable full regulator activity.

We also demonstrated that the *qsmR* mutation resulted in higher transcription of both *rhl* operon, but the impact is more important on the *rhIA2* operon. Dubeau et al (2009) reported that both *rhIA* alleles are functional and necessary for maximal rhamnolipid production. However, *rhIA1*- mutant produces more rhamnolipids than the *rhIA2*- mutant (Dubeau *et al.*, 2009), indicating that the two operons are differently regulated. Our recent data with the ScmR transcriptional repressor confirm this model, where both operons were differently regulated (**Section 4**). We demonstrated here that *qsmR* plays a bigger role into the regulation of the *rhIA2* operon compared to the *rhIA1* operon.

In *B. thailandensis*, *qsmR* may be part of an operon with three other genes (BTH_I2866, BTH_I2867 and BTH_I2868), respectively coding for *mdtABC* homologs. The *mdtABC* genes belongs to the Resistance Nodulation and cell Division (RND) transporter family. Little is known on how the rhamnolipids are exported outside the cell, so we hypothesized that rhamnolipid overproduction in the *qsmR* mutant could be explained by an enhancement of the efflux system coded by the *mdtABC* genes. RND transporters can be classified into two different subfamilies according to their substrates, the hydrophobic and amphiphilic efflux RND (HAE-RND) family and the heavy metal efflux RND (HME-RND) family (Nies, 2003). MdtAB belongs to the HAE-RND subfamily in *E.coli* (Anes *et al.*, 2015). The RND transporters have wide substrate specificity and require TolC for their function (Fralick, 1996, Nishino *et al.*, 2003, Sharff *et al.*, 2001). Even if we found that rhamnolipids concentrations were similar between the *mdtA*-, *mdtB*- and *mdtC*- mutants and the WT it is still possible they could be involved in the export of rhamnolipids outside the cell. Several studies demonstrated that all components of the *mdtABC* systems or the associated *tolC* gene have to be inactivated to observe an effect on the transportation of molecules. For example, individual deletions of *acrB*, *acrD*, and *mdtABC* did not affect the ability

of *E. coli* cells to excrete enterobactin, whereas a triple deletion of these genes resulted in a significant decrease in enterobactin export (Horiyama *et al.*, 2014).

Our study is the first to implement a directed evolution approach to increase the production of a surface-active metabolite. We believe this approach is very promising and could be successfully applied to other biosurfactant-producing organisms. Our finding opens new perspectives about unknown regulation systems directly or indirectly involved in rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis* and could be of interest for the development of metabolic engineering tools for large-scale rhamnolipid production.

5.7 Supplementary Figure S1

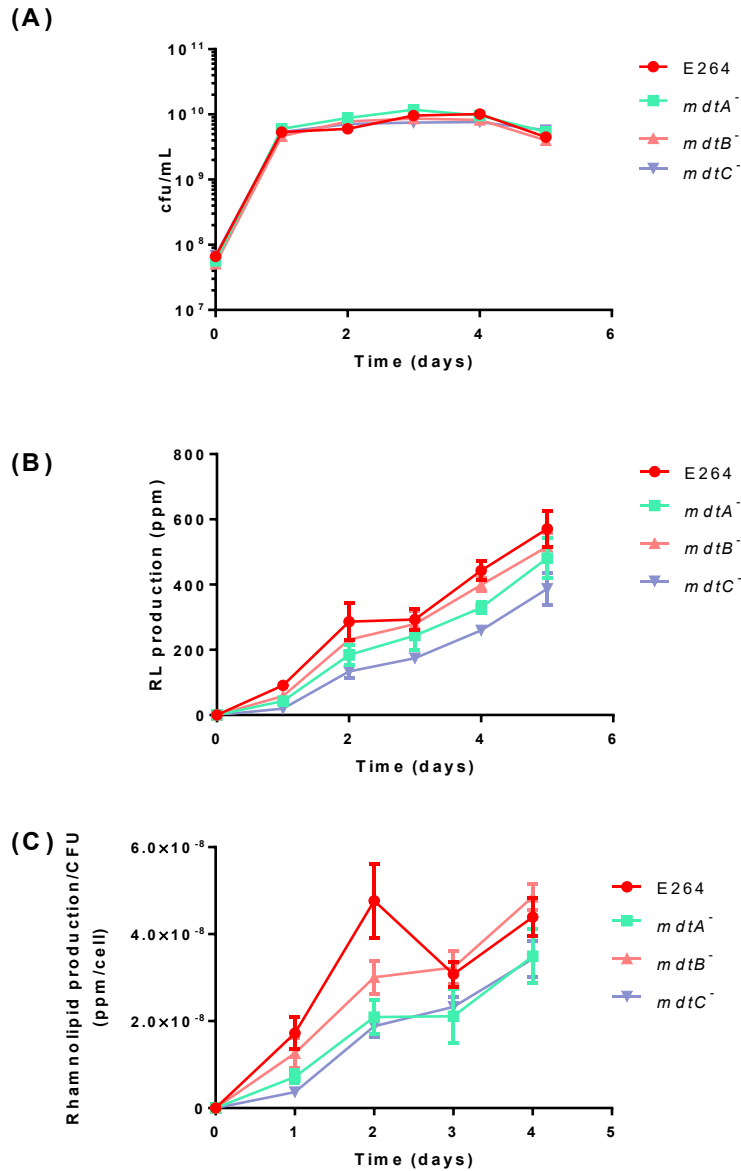


Figure 5.8 : Single mutation in *mdtABC* system did not affect rhamnolipid concentration in supernatant.

Growth was evaluated by CFU counts (A). Rhamnolipid quantification by LC-MS are presented in (B) rhamnolipid productivity (ppm rhamnolipid*mL/CFUs) (C). The values are means ± standard deviations (error bars) for three replicates.

5.8 Funding informations

This work was supported by Discovery grant No. RGPIN-2015-03931 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SM was recipient of a Ph.D. scholarship awarded by the Fondation Armand-Frappier. DNB is the recipient of an NSERC Postgraduate Scholarships-Doctoral (PGS D) award. ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

5.9 Acknowledgements

We want to thank Marie-Christine Groleau for technical advice and reviewing the manuscript.

5.10 Présentation des résultats additionnels de l'article

5.10.1 Complémentation du mutant *qsmR*

La complémentation a été réalisée en tubes contenant 3mL de milieu NB supplémenté avec 4% de glycérol. Après 5 jours de cultures, les rhamnolipides ont été quantifiés.

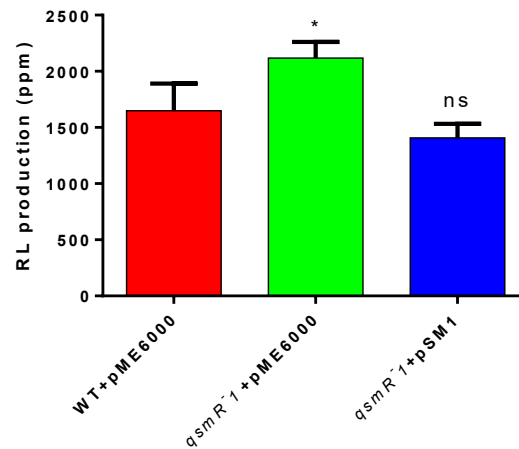


Figure 5.9 : Wild type phenotype is restored by *qsmR* complementation.

Les rhamnolipides ont été quantifiés après 5 jours de culture en milieu NB + 2% glycerol à 30°C. Les expériences ont été réalisées en triplicats. Les valeurs représentent les moyennes ± déviations standards (barres d'erreur).

5.10.2 Caractérisation phénotypique des évoluants sélectionnés

Après les 10 passages réalisés dans le milieu contenant 1,5% d'agar, deux clones ont été sélectionnés dans les populations résultantes sur la base de leur phénotype surproducteur de rhamnolipides après 5 jours de cultures en milieu liquide NB supplémenté avec 2% (v/v) de glycérol (Fig. 5.3). Nous avons également réalisé des essais de motilité sur ces clones. Les résultats sont présentés dans les deux sections suivantes.

5.10.2.1 Essais de motilité de type *swarming*

La motilité de type *swarming* requiert à la fois la production de rhamnolipides et la présence d'un ou plusieurs flagelles fonctionnels. Nous avons dans un premier temps réalisé des essais de motilité de type *swarming* pour les deux clones issus de chaque lignée d'évoluants et comparé leur phénotype à celui obtenu par la souche ancestrale E264 (**Fig 5.10**). Comme attendu, les clones sélectionnés issus des lignées 2 et 3 présentent un phénotype *hyperswarmer* par rapport à la souche ancestrale E264, lié à la surproduction de rhamnolipides chez ces souches évoluées.

Cependant, de façon intéressante, les clones issus de la lignée 1 présentent un défaut de *swarming*. Puisque nous avons démontré que la production de rhamnolipides en culture liquide est supérieure chez ces évoluants à celle de la souche ancestrale, cette absence de motilité de type *swarming* suggère que la mutation engendrée par l'évolution dirigée a également affecté la fonction flagellaire de la bactérie de façon négative.

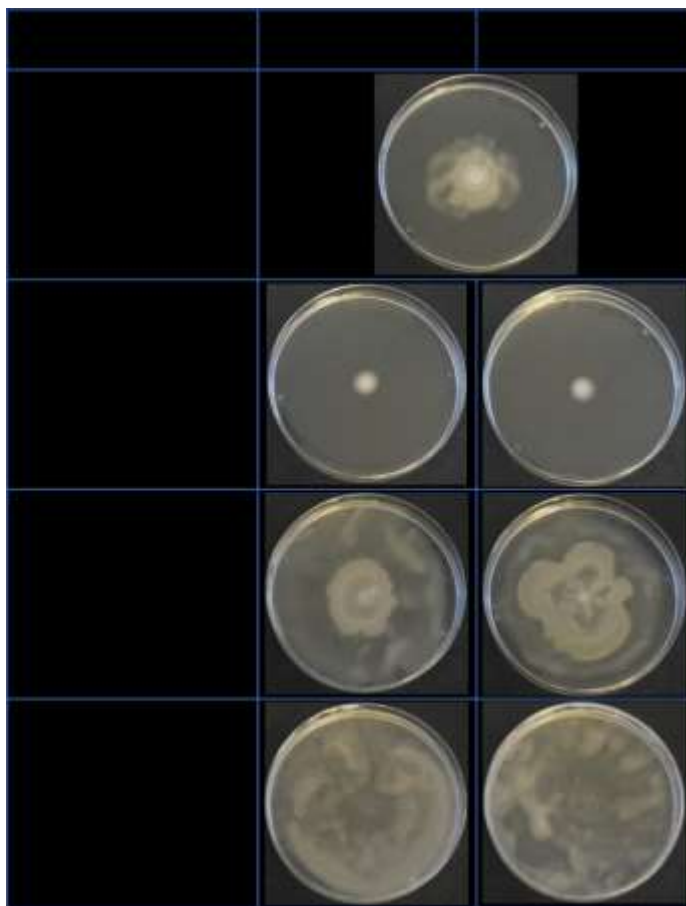


Figure 5.10 : Essais de motilité de type swarming chez les évoluants sélectionnés dans chaque lignée.

Les plaques de swarming (NB+2% dextrose, 0,5% agar) ont été ensemencées avec 5 μ L de solution bactérienne ajustée à $DO_{600}=3$ et incubées pendant 16h à 30°C. Les expériences ont été réalisées en triplicats. Des essais ont été réalisés avec la souche ancestrale E264 comme témoin.

5.10.2.2 Essais de motilité de type *swimming*

Étant donné les observations réalisées pour les évoluants issus de la lignée 1, nous avons réalisé des essais de motilité de type *swimming*, qui ne requiert pas de rhamnolipides. Pour ce faire nous avons préparé des géloses contenant 20 mL de milieu LB solidifié avec 0,3% agar (Murray *et al.*, 2006). Après inoculation au cure-dent, les boîtes ont été incubées pendant 24h à 30°C (**Fig 5.11**).

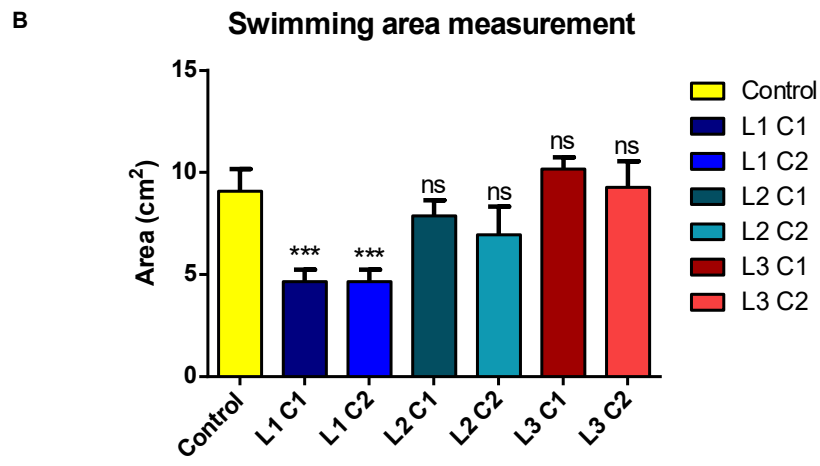
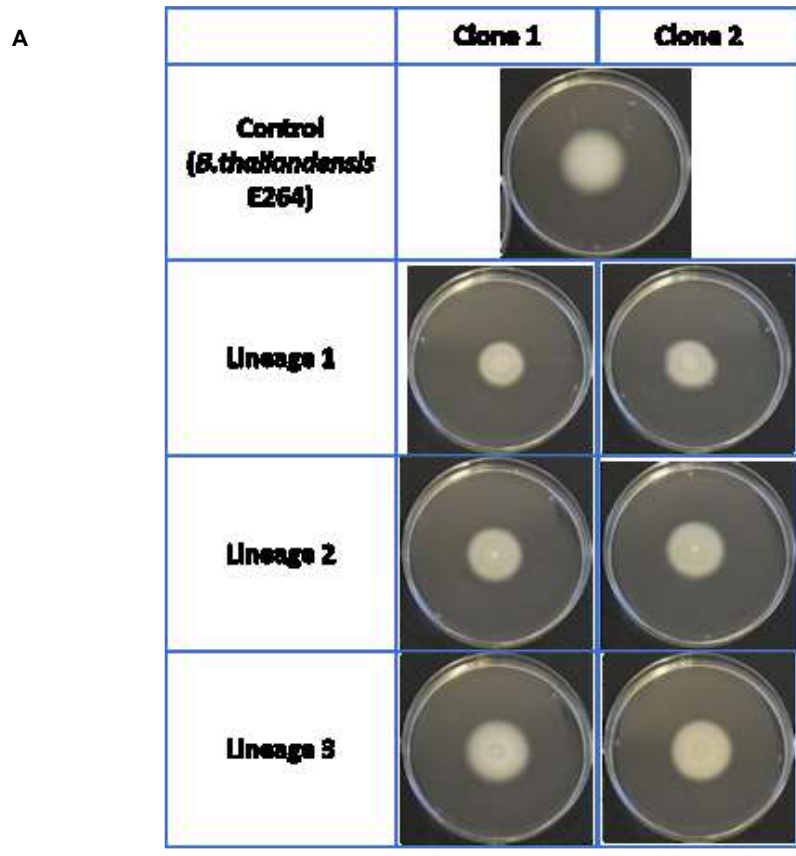


Figure 5.11 : Essais de motilité de type swimming chez les évolutifs sélectionnés pour chaque lignée.

Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. Les expériences ont été réalisées en triplicats. Les données ont été analysées en utilisant un test ANOVA puis un test de comparaison multiple de Dunnett (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

On constate que les deux clones de la lignée 1 ont effectivement un défaut de motilité *swimming*.

5.10.3 Etude des mutations trouvées dans les évoluants des lignées 1 et 3

5.10.3.1 Les caroténoïdes jouent un rôle dans la fonction flagellaire et la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*

Les deux évoluants sélectionnés issus de la lignée 1 portent la même mutation, située dans le gène BTH_I2820. A partir de la séquence nucléique, nous avons généré la séquence protéique présentée ci-dessous (**Tableau 5.4**). La délétion observée dans la séquence des évoluants n'entraîne pas de changement de cadre de lecture et se traduit par la disparition d'un motif répété dans cette région, à savoir un triplet d'acides aminés (L, N et R). La séquence de la souche ancestrale présente une répétition de huit de ces motifs LNR alors qu'on n'en compte seulement sept chez l'évoluant. L'analyse de la structure protéique indique que ni le site catalytique ni la structure secondaire de la protéine ne sont affectés par cette mutation. Pour vérifier si l'activité catalytique de la protéine produite est augmentée ou au contraire diminuée, une perspective serait l'étude du mutant du gène BTH_I2820.

Tableau 5.4 : Comparaison des séquences protéiques liée à la mutation dans le gène BTH_I2820 par rapport à la souche E264

WT	MTTIDLNAGALAPVADEIDAVDLRVSGAIPREP
mutant	MTTIDLNAGALAPVADEIDAVDLRVSGAIPREP
WT	GVLVRNGPNPLRGRFDGSDVLSWWPEDAMLH
mutant	GVLVRNGPNPLRGRFDGSDVLSWWPEDAMLH
WT	AISFDHGRATRYRNAGRARSAGRACTIRRGRRR
mutant	AISFDHGRATRYRNAGRARSAGRACTIRRGRRR

des protéines membranaires impliquées dans la signalisation cellulaire et le transport, affectant ainsi à la fois la fonction flagellaire et l'export des rhamnolipides.

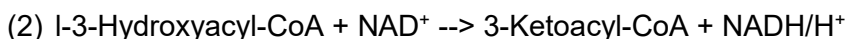
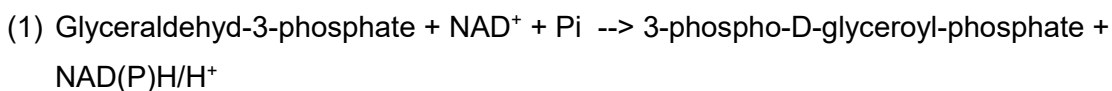
5.10.3.2 Un nouveau régulateur de type TetR est impliqué dans la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

L'analyse de la structure protéique que nous avons effectuée a montré que la délétion des deux nucléotides dans la séquence de l'évoluant C5 issu de la lignée 3 entraîne un changement de cadre de lecture au sein du gène BTH_II0885. Un codon STOP est introduit au sein de la séquence protéique 115 acides aminés plus tôt par rapport à la séquence de la souche sauvage (**Tableau 5.5**). La protéine synthétisée chez l'évoluant serait donc incomplète. De plus la délétion GC se trouve dans le domaine TetR de la protéine, qui se situe entre le 12^{ème} et le 173^{ème} résidu, confirmant l'inactivation de la protéine codée par le gène BTH_II0885.

Les régulateurs de la famille TetR sont connus pour interagir avec une grande diversité de petites molécules, incluant les antibiotiques, les métabolites ou encore les molécules de signal cellule-cellule (Cuthbertson *et al.*, 2013). Les membres de cette famille de régulateurs sont des répresseurs (Ramos *et al.*, 2005) qui peuvent être classés en trois types selon leur orientation et la proximité du gène structural par rapport aux gènes adjacents sur le chromosome. Ces relations peuvent être utilisées pour prédire les gènes ciblés par les régulateurs de la famille TetR (Ahn *et al.*, 2012). Le premier groupe comprend les régulateurs qui divergent par rapport au gène voisin dont il peut être séparé par une région de taille variable. Le second groupe concerne les régulateurs qui sont co-transcrit avec le gène qu'ils régulent. Enfin le dernier groupe englobe les régulateurs qui n'entrent dans aucun des deux groupes précédents (Ahn *et al.*, 2012).

Si ces modèles prédictifs s'avèrent justes, dans le cas de l'évoluant issu de la lignée 3, il est probable que le régulateur muté affecte le gène *nadE*, codant pour une NAD synthetase. En effet, ce gène est distant de 232 pb du régulateur, et dans le sens inverse, suggérant que l'on a un régulateur de la famille TetR appartenant au type 1. Plus précisément, le gène *nadE* code pour une nicotinamide adenine dinucleotide synthetase, qui catalyse l'amination de l'acide nicotinique adenine dinucleotide (NaAD) pour former du NAD⁺. Cette réaction représente la dernière étape dans la majorité des voies métaboliques pour la biosynthèse de NAD⁺. NadE utilise soit la glutamine soit l'ammonium en tant que donneur d'azote, et la réaction a lieu grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Laskoski *et al.*, 2016). La dérégulation de *nadE* chez l'évoluant considéré

pourrait mener à une plus grande disponibilité en NAD⁺, qui peut être utilisé dans différentes voies métaboliques, incluant la voie du glycérol (1) ou encore la voie de la β-oxydation (2) (Henkel *et al.*, 2012) :



Ces deux voies sont impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides donc une plus grande production de ces intermédiaires réactionnels pourrait expliquer la surproduction observée chez l'évoluant.

Tableau 5.5 : Comparaison des séquences protéiques liée à la mutation dans le gène BTH_I10885 par rapport à la souche E264

WT	MPTTVSAPET LSETRTQTRE LLLQTALSML EQGWFPSITE LANASGVSR
TetR mutant	MPTTVSAPET LSETRTQTRE LLLQTALSML EQGWFPSITE LANASGVSR
WT	TAYRYFPSQA ALVSTVDES LGPVLQWQPT STSVEARVNE LLDFAYPRME
TetR mutant	TAYRYFPSQA ALVSTVDES LGPVLQWQPT STSVEARVNE LLDFAYPRME
WT	QHEGALRAAL QVALHQWANE RARRAQDEPK YRRGNRRRL MLAVEPMVQA
TetR mutant	QHEGALRAAL QVALHQWANE RAARAGRAEV PARCPPTAAH ARRRADGAGG
WT	GVDPAVAARL AQSLSLLYGT EAMVVLKDIW GLDFREFMSV IKWMSSALAE
TetR mutant	GRSRGGRAAR AVAVVALRHR GDCRAEHLG ARLP
WT	AGGAAGAGSD AAASGHGAAQ GASSAEGVAG ADRLEGSERE RSAQAAHDAG
TetR mutant	
WT	AAADAAPDGG RAAIVQGGGG GAGSADQASG AAGERAADRP PAALASDGDE
TetR mutant	
WT	RDA
TetR mutant	

5.10.4 Modélisation du site de reconnaissance de ligand du régulateur QsmR

QsmR étant un régulateur de type lclR, il comporte deux sites importants pour son activité : un site de fixation à l'ADN et un site de reconnaissance de ligand. Les mutants que nous avons générés par évolution dirigée portent des mutations soit dans le site de fixation à l'ADN, soit dans le site de reconnaissance de ligand, le rendant non-fonctionnel. D'après la littérature, les effecteurs pouvant interagir avec ce type de récepteurs sont de petites molécules, correspondant par exemple à des molécules de signalisation. Nous avons émis l'hypothèse que les AHL pourraient être ces effecteurs. En effet, *B. thailandensis* possède trois systèmes de quorum sensing, menant à la synthèse de différentes AHL : C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. De plus le régulateur QsmR serait sous le contrôle du quorum sensing chez *B. thailandensis* (Goo *et al.*, 2012, C Majerczyk *et al.*, 2014a)

Par différents outils bio-informatiques, nous avons modélisé le site de reconnaissance du ligand du régulateur QsmR.

5.10.4.1 Modélisation par homologie de QsmR chez la souche sauvage E264

Aucune structure 3D de QsmR n'est à ce jour publiée. Afin de générer le modèle comparatif de la protéine QsmR, deux recherches indépendantes par PSI-BLAST et HHBlits ont été réalisées dans le but d'identifier des protéines homologues (Altschul *et al.*, 1997, Remmert *et al.*, 2012). Les résultats de ces deux techniques ont permis d'identifier la protéine 5WHM, présentant 35% d'identité et 56% de similarité avec QsmR, avec une couverture d'environ 80%. Nous avons construit indépendamment deux modèles pour la protéine QsmR, basés sur les algorithmes de I-Tasser et SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014, Jianyi Yang *et al.*, 2015). Nous avons ensuite sélectionné le meilleur modèle issu de chaque approche en se basant sur les scores fournis par les logiciels, et poursuivi la validation en utilisant divers protocoles : RAMPAGE, VERIFY_3D, ERRAT, PROCHECK, WATCHCHECK and QMEAN-DisCo (Colovos *et al.*, 1993, Laskowski *et al.*, 1993, Lovell *et al.*, 2003, Lüthy *et al.*, 1992, Waterhouse *et al.*, 2018). Finalement, le modèle donné par l'algorithme SWISS MODEL a été choisi du fait qu'il présentait la meilleure qualité de modèle pour la protéine cible QsmR.

5.10.4.2 Docking in-silico

Avant la simulation de docking moléculaire, le modèle QSMR a été solvato avec des molécules d'eau en utilisant le protocole standard de minimisation YASARA (Krieger *et al.*, 2009). Les molécules identifiées comme potentiels ligands du régulateur QsmR, i.e. la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL, correspondant aux AHL produites par les systèmes de quorum sensing retrouvés chez *B. thailandensis*, ont été obtenues par le serveur "SMILES translator and structure file generator" du NIH. Le docking moléculaire a été réalisé en deux étapes. Dans un premier temps, la surface de toute la protéine a été utilisée. Les résultats de ce premier test ont révélé que parmi les cavités retrouvées à la surface de QSMR, celle formée par les feuillets β 3-8 de la protéine modèle représentait la meilleure position pour la fixation des ligands. Dans un second temps, nous avons optimisé la recherche des meilleures positions des trois différents ligands dans la cavité identifiée précédemment. Les résultats suggèrent que les molécules C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL pourraient se lier dans cette cavité de façon spontanée et très favorable (**Tableau 5.6**). Le logiciel Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) a ensuite été appliqué de façon à simuler les complexes d'interactions entre le modèle QSMR et les ligands potentiels. La fonction de score MolDock a été utilisée pour identifier les meilleures positions et l'algorithme de prédiction de la cavité fourni par MVD a été appliqué pour explorer la surface de la protéine à la recherche de potentiels sites de liaison. Trente simulations ont été réalisées, avec une itération de 2000 cycles, ce qui a permis d'explorer environ 3 000 000 de complexes par ligand testé. Enfin le logiciel USCF Chimera 1.1 a été utilisé pour toutes les analyses et la visualisation des structures moléculaires réalisées dans ce travail (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>) (**Fig. 5.12**).

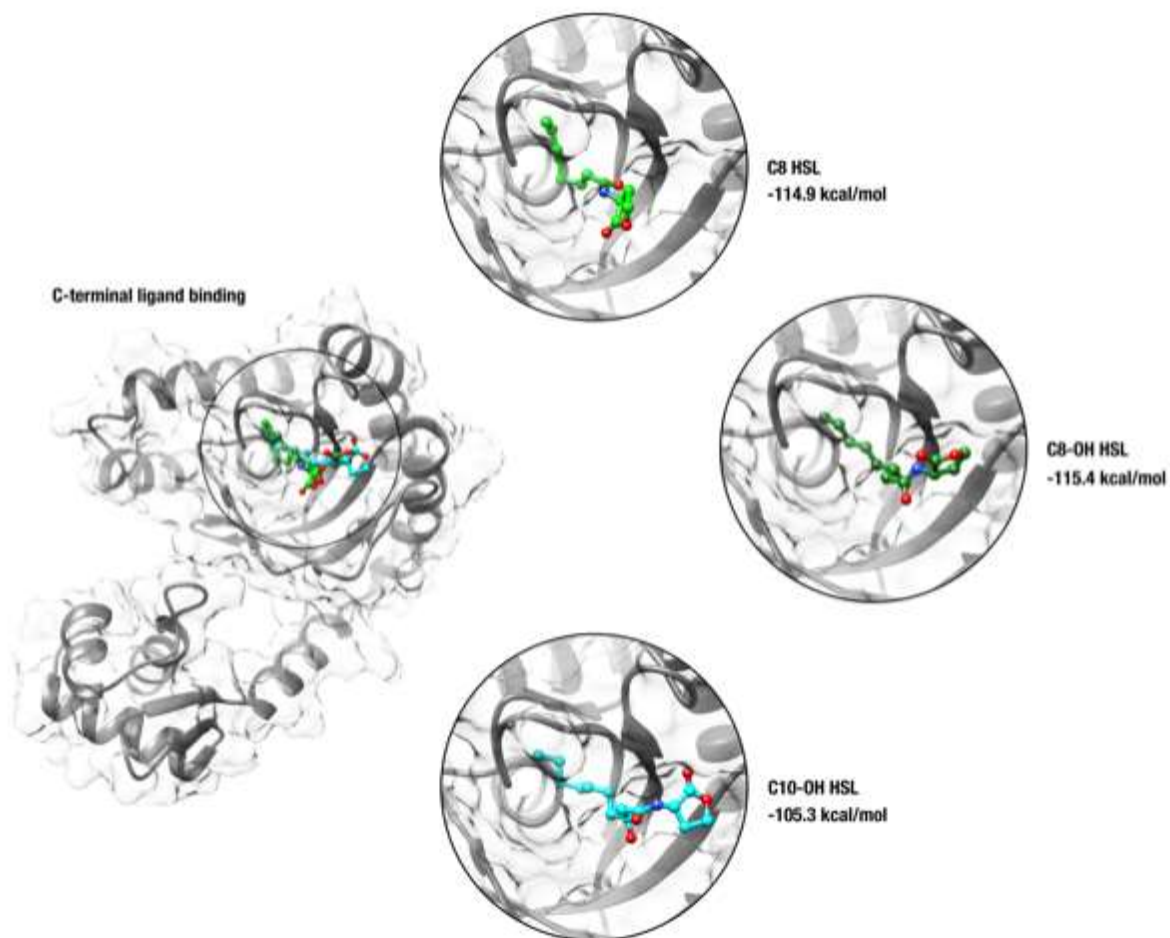


Figure 5.12: Modélisation du site de reconnaissance du ligand du régulateur QsmR.

Les différents ligands sont représentés dans la cavité correspondant au site de reconnaissance de QsmR. Les valeurs associées représentent les valeurs d'énergie libre de Gibbs, qui traduisent un événement spontané puisqu'elles sont négatives.

Tableau 5.6: Energies associées à l'interaction entre les homo-sérines lactones et le site de reconnaissance du ligand de QsmR

LIGAND POTENTIEL	ENERGIE
C ₈ -HSL	-114.9 kcal/mol
C ₈ -OH HSL	-115.4 kcal/mol
C ₁₀ -OH HSL	-105.3 kcal/mol

Cette analyse supporte donc une hypothèse selon laquelle une ou plusieurs des homosérine lactones produites par *B. thailandensis*, à savoir la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et/ou la 3OHC₁₀-HSL pourrait être un ligand de QsmR. Peu de ligands pouvant interagir avec les régulateurs de type IclR ont été identifiés. Cependant, une étude a déjà rapporté que la N-3-oxo-octanoyl homosérine lactone était un ligand de ce type de récepteur chez *Agrobacterium tumefaciens* (Hai-Bao Zhang *et al.*, 2002). Ainsi, bien que les homosérines lactones soient principalement connues pour se lier aux régulateurs de type LuxR, il pourrait être envisagé qu'elles jouent le rôle de ligands pour d'autres types de régulateurs.

5.10.5 Étude de la production de PHA chez le mutant *qsmR*⁻

B. thailandensis est capable de produire des PHAs (Funston *et al.*, 2017) (**Section 3**). La production des PHAs et celle des rhamnolipides sont souvent étudiées de pair dans la mesure où ils sont étroitement liés d'un point de vue structurel : ces deux métabolites sont entre autres composés de chaînes d'acide gras. Nous avons en effet remarqué dans le chapitre 3 que chez le mutant *scmR*, produisant davantage de rhamnolipides, la production de PHA se trouve abaissée. La compétition pour les précurseurs lipidiques entre les voies métaboliques menant à la synthèse des PHAs ou des rhamnolipides a été suggérée (Funston *et al.*, 2017).

Étant donné que nous avons observé la surproduction de rhamnolipides chez le mutant *qsmR*⁻ nous avons vérifié si la synthèse des PHAs était aussi affectée. Pour ce faire nous avons réalisé des cultures en milieu NB+4% glycérol pendant 5 jours à 30°C. La production de PHA a été mesurée quotidiennement par marquage fluorescent au Nile blue. Les résultats sont présentés dans la **Figure 5.13**. A croissance égale, la production de PHA ne semble pas être affectée de façon significative dans le mutant *qsmR*⁻ comparé à la souche sauvage E264.

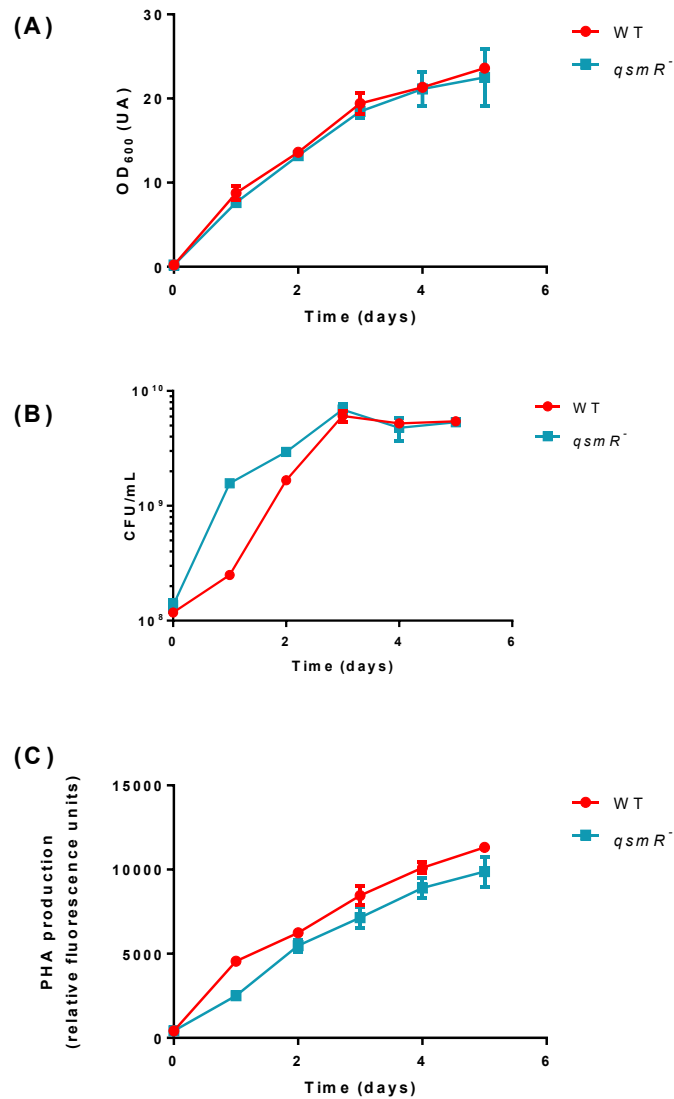


Figure 5.13: La production de PHA n'est pas affectée chez le mutant *qsmR*⁻ comparé à la souche sauvage E264.

J'ai également réalisé des images de microscopie électronique au jour 4 de culture (Fig 5.14). Ces images confirment que la surproduction de rhamnolipides chez le mutant *qsmR*⁻ n'affecte pas la production de PHAs comparé à la souche sauvage.

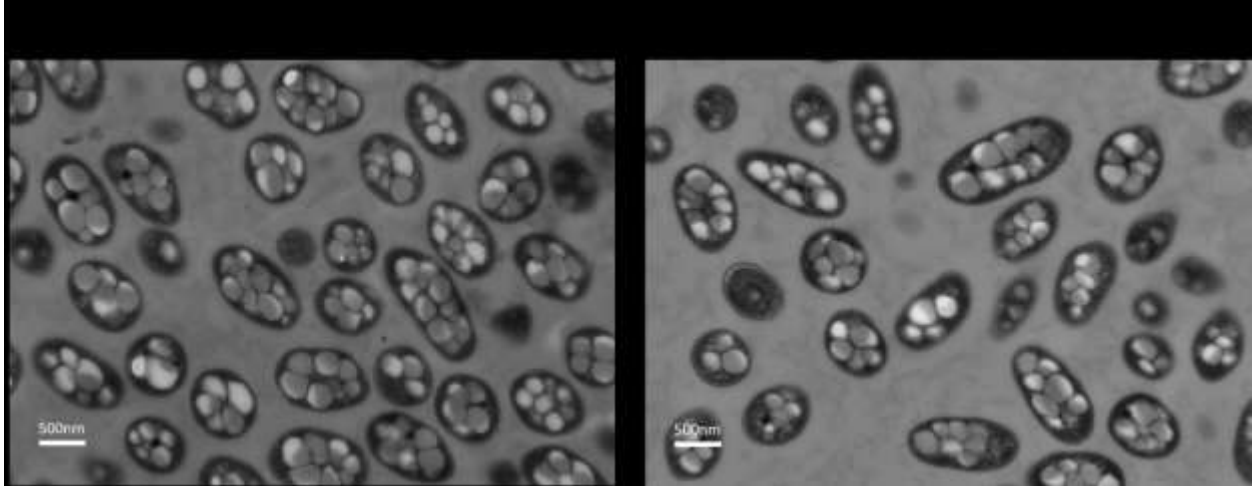


Figure 5.14: Images en microscopie électronique pour visualiser les PHAs dans la souche sauvage *B. thailandensis* E264 (A) et le mutant *qsmR* (B).

5.10.6 Conclusions générales

L'évolution dirigée a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes influençant la production des rhamnolipides. De façon intéressante, l'évolution a convergé vers l'apparition de mutation dans le gène *qsmR* puisque 3 des 6 évoluants séquencés portaient une ou plusieurs mutations dans ce gène. Deux autres mutations ont révélé leur importance quant à la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis* : BTH_I2820 et BTH_I10885, dont le rôle ici reste indéterminé. Cependant la mutation dans la caroténoïde 9,10 cleavage deoxygenase semble également affecter la fonction flagellaire de la bactérie, tel que suggéré par les expériences de motilité de type *swimming*.

6 PRESENTATION DE L'ARTICLE 4.

Genes implicated in polyhydroxyalkanoate biosynthesis as possible targets for rhamnolipid production enhancement in *Burkholderia thailandensis*

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des polyhydroxyalcanoates pourraient représenter des cibles d'ingénierie métabolique pour l'augmentation de la production de rhamnolipides chez *Burkholderia thailandensis*.

Auteurs :

Sarah Martinez et Eric Déziel

INRS - Institut Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Laval, Québec, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Non soumis.

Contribution des auteurs :

SM : planification du design expérimental, réalisation des expérimentations, rédaction du manuscrit

ED : planification du design expérimental, rédaction du manuscrit

Nous avons démontré précédemment que *B. thailandensis* présente un bon potentiel de production de PHAs. Les PHAs et les rhamnolipides sont souvent étudiés de pair étant donné qu'ils partagent le même *pool* de précurseurs au niveau de la chaîne d'acide gras. Nous avons donc décidé d'étudier la relation entre les deux métabolites afin de déterminer si leurs

biosynthèses sont compétitives. Si tel est le cas, une stratégie d'optimisation par ingénierie métabolique pourrait être envisagée afin de rediriger les flux de carbone vers la voie de synthèse de l'un ou l'autre de ces métabolites.

6.1 Abstract

Rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates are valuable secondary metabolites representing an increasing interest for companies, because of the generated pollution caused by their synthetic counterparts. However, biotechnological processes are not fully competitive yet, principally due to the low yields and high production costs. Since *Burkholderia thailandensis* produces these two metabolites, this bacterium seems to be an ideal candidate for the implementation of production processes at larger scale. However, limited knowledge on the regulation of both rhamnolipid and PHA biosynthesis in *B. thailandensis* represents an obstacle. Metabolic engineering is a current strategy used to maximize the biosynthesis of one specific metabolite in bacteria. We investigated the relation between rhamnolipid and PHA production by studying either the rhamnolipid-null *rhIA1/rhIA2*- or PHA-null *phaC*- mutants to evaluate the impact of the disruption of these pathways. We determined that they do not directly compete. In contrast, we identified a new activator of rhamnolipid production, PhaR, which is involved in both pathways, activating PHA depolymerisation and could represent a target for metabolic engineering in order to increase rhamnolipid biosynthesis.

6.2 Introduction

The interest of the industry for microbial surfactants and plastics as replacements for chemical-sourced products is growing. Indeed, the current production processes are not environmentally friendly and there is more and more desire to find valid and sustainable alternatives.

As biosurfactants, rhamnolipids have been extensively studied since their early identification in *Pseudomonas aeruginosa* cultures in the late 1940s (Jarvis *et al.*, 1949). The amphiphilic character of rhamnolipids is due to the hydrophilic sugar, rhamnose, and the hydrophobic moiety composed of a dimer of two esterified β -hydroxy-fatty acids. These compounds are a diverse group of molecules comprising more than 60 reported congeners (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Three enzymes catalyze the rhamnolipid production: RhIA, RhIB and RhIC, encoded by the *rhIA*, *rhIB* and *rhIC* genes, respectively. In *P. aeruginosa*, RhIB and RhIC are well characterized as rhamnosyltransferases and it was reported that RhIA is required for the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid (HAA) biosynthesis, the precursor of RhIB (Deziel *et al.*, 2003). However, the substrate of RhIA is controversial, and so the pathways involved into their synthesis. Indeed, in *P. aeruginosa*, coenzyme A (CoA)-activated 3-hydroxy fatty acids were concluded as

precursors of HAAs (Burger *et al.*, 1962) while RhIA was reported to also convert β -hydroxyacyl-ACP to the HAA intermediate for rhamnolipid production (K Zhu *et al.*, 2008). Other studies corroborated the fact that the coenzymeA activates the 3-hydroxy fatty acids in order to be used as a substrate for RhIA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014, Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2019).

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyhydroxyesters formed from short- or medium-chain hydroxyalkanoic acids (HAs), depending on the pathway (Bernd, 2003). PHA granules are an amorphous polymer and are covered by a dense layer consisting of mainly proteins such as phasins, PHA synthase (Mezzina *et al.*, 2016). They are synthesized by different prokaryotic microorganisms as intracellular carbon storage material (Anderson *et al.*, 1990b). For instance, in *Cupriavidus necator*, short-chain length-PHAs are usually synthesized in high amounts, making this bacterium a model for the study of PHA biosynthesis (Tan *et al.*, 2014). The condensation of two molecules of acetyl coenzyme A (CoA) by PhaA allows the formation of acetoacetyl-CoA. Then, acetoacetyl-CoA is reduced to 3-hydroxybutyryl-CoA by PhaB. These monomeric units are polymerized to PHB by the synthase PhaC (Uchino *et al.*, 2007). Other genes are involved in the regulation of PHA production. For instance, PHB depolymerases (PhaZs) can hydrolyze the polymer by different mechanisms. Indeed the depolymerization by thiolysis produces HA-CoA while hydrolysis degrades the PHA into HA (Brigham *et al.*, 2012). Phasins (PhaP) also play an important role in PHA metabolism in the *C. necator* model (York *et al.*, 2002) and are related to a regulator named PhaR (York *et al.*, 2001).

Obtaining sufficient yield from microbial fermentation associated with cost-effective downstream processing strategies in order to develop a commercially viable final product still represents a challenge for the industry. It is then important to find ways to optimize both rhamnolipid and PHA productions.

Burkholderia thailandensis is a Gram-negative bacterium endemic to Southeast Asian and northern Australian soils. As it is a non-pathogenic agent, it is commonly used as a model organism for the closely related pathogens *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* (Yu *et al.*, 2006). *Burkholderia thailandensis* is capable of synthesizing both rhamnolipids (Dubeau *et al.*, 2009) and polyhydroxybutyric acids (PHBs) (Funston *et al.*, 2017, Kourmentza *et al.*, 2018). However, the regulation of those metabolites in this bacterium is poorly documented.

Metabolic engineering is a strategy which can be used for improvement of both new and existing enzymatic reactions (Nielsen, 1998). In the *B. thailandensis* context, this strategy could be useful to maximize either rhamnolipid or PHA biosynthesis. Importantly, although suggested previously (Funston *et al.*, 2017), we still do not know if there is a competition between the

productions of those two metabolites. From a structural point of view, both rhamnolipid and PHA harbor a fatty acid component, representing either the hydrophobic apolar tail or the monomeric unit respectively. This similarity of structure suggests that rhamnolipid and PHAs could compete for the same precursors (Funston *et al.*, 2017). Recently, Irorere *et al.* reported that the lipid precursors for rhamnolipid production were provided by the fatty acid synthesis pathway in *B. thailandensis* (Irorere *et al.*, 2018). A better understanding of the cross-related pathways for PHA and rhamnolipid production would allow the implementation of an efficient metabolic engineering strategy.

6.3 Materials and methods

6.3.1 Microorganisms and culture conditions:

Strains shown in **Table 6.1** were routinely grown from frozen stocks by culturing at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) and 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. For 125 mL-flask cultures, 25 mL of BD nutrient broth (NB) medium (Difco, Mississauga, ON, Canada) complemented with 2% glycerol (w/v) were inoculated at a target OD₆₀₀ of 0.2 (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) and incubated at 30°C in a rotary shaker at 200 rpm (Infors). Samples were collected daily for OD₆₀₀ measurements, CFU counts, and quantification of PHA and rhamnolipids.

Tableau 6.1: Strains used in this study:

Name	Characteristic	Reference
<i>B. thailandensis</i> E264	Wild type strain	(Paul J Brett <i>et al.</i> , 1998)
<i>phaC</i> - BT10416	E264 <i>phbC148::ISlacZ</i> - <i>PrhaBo-Tp/FRT</i> , <i>Tp^R</i>	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
<i>rhlA1/A2</i> -	Double mutant <i>rhl</i> in E264	(Dubeau <i>et al.</i> , 2009)
<i>phaR</i> - BT01124	E264_ <i>phaR168::ISlacZ/hah</i> transposon, <i>Tc^R</i>	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)

Tp: trimethoprim; Tc: tetracycline

6.3.2 CFU counts:

Samples were collected, serially diluted and subsequently plated on LB agar plates and incubated for 24 hours at 37°C. Colonies were counted to determine bacterial cell density (CFU/mL) at each time point.

6.3.3 Quantification of rhamnolipids:

Rhamnolipid concentration in bacterial cultures was determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). After six days of growth, 500 µl were retrieved and the OD₆₀₀ was measured. Then the samples were centrifuged at 16,800 × *g* for 10 min to remove the bacteria. Five-hundred µl of methanol and 10 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) as the internal standard were added (Dubeau *et al.*, 2009) to 500 µL of supernatant. The detector is a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode.

6.3.4 Quantification of PHA:

PHA accumulation was measured as described before (Oshiki *et al.*, 2011), with some adjustments. Samples (100 µL) of culture were collected, centrifuged for 3 min at 16,800 × *g*, supernatants were discarded and pellets were finally suspended in 100 µL reverse osmose water. Samples were placed at 100°C for 10 min and immediately transferred onto ice for 5 min. After heatshock, samples were centrifuged during 3 min at 16,800 × *g*. Supernatants were discarded and pellets were suspended in 100 µL reverse osmose water. Samples were transferred in a 96-well plate and an equal volume of 0.02% (w/v) Nile Blue (Sigma Aldrich) solution was added to each well. After 4 min of incubation, the intensity of fluorescence was measured using a Cytation fluorescence microplate reader (Biotek), at excitation and emission wavelengths of 490 and 590 nm, respectively.

6.3.5 RNA extraction.

Total RNA of *B. thailandensis* E264 and *phaR*- mutant cultures was extracted at day 1, day 2 and day 3 as described in **Section 5.4.9**.

6.3.6 RT-PCR quantitative:

cDNA synthesis and quantitative PCR were performed as previously described (Le Guillouzer *et al.*, 2017). The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Table 6.2**. Differences in gene expression between *B. thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as significant.

Tableau 6.2: Primers used for qRT-PCR

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5'to 3')	Reference
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F SLG_qRT-PCR_ndh_R	ACCAGGGCGAATTGATCTC GATGACGAGCGTGTCGTATT	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
<i>phaC</i>	phaC_thai_fwd phaC_thai_rev	GATCTGCTGTACTGGAACG AGCTTGTTCTCGAGATAGGT	This study
<i>phaP</i>	phaP_thai_fwd phaP_thai_rev	ACAACGTCGCGAAGAAC CTTCTGCACCGTTTCGTA	This study
<i>phaZ</i>	phaZ_BTH_I0973_fwd phaZ_BTH_I0973_rev	TCTCACTGGGACTTCTATCA TGTATTCGTCGTAGAAGCG	This study

6.4 Results

6.4.1 PHA and rhamnolipid biosynthesis are not linked

In order to verify whether rhamnolipids and PHAs production compete for the same precursors, we performed cultures of the wild-type strain of *B. thailandensis* wild-type and the *phaC*- mutant in NB medium supplemented with 2% glycerol.

Production of rhamnolipid by the *phaC*- mutant in NB medium supplemented with 2% glycerol was already reported (Funston *et al.*, 2017) Their study showed a high production of rhamnolipids in the *phaC*- mutant compared to the WT, using dry cellular biomass for growth normalization. In contrast, we recently showed that PHA are abundantly produced under our conditions used for rhamnolipid production. In other bacteria and conditions, PHA can represent

until 75% of the dry cellular biomass (Anderson *et al.*, 1990b), making this parameter unreliable for growth assessment. We recently demonstrated that OD₆₀₀ is not representative of growth under conditions when PHA granules can accumulate (**Section 3**), as seen again here (**Fig. 6.1A** and **B**), so we monitored growth by viable cell counting.

In NB medium supplemented with 2% glycerol, we noted that rhamnolipid production was actually similar for both strains (**Fig. 6.1C**).

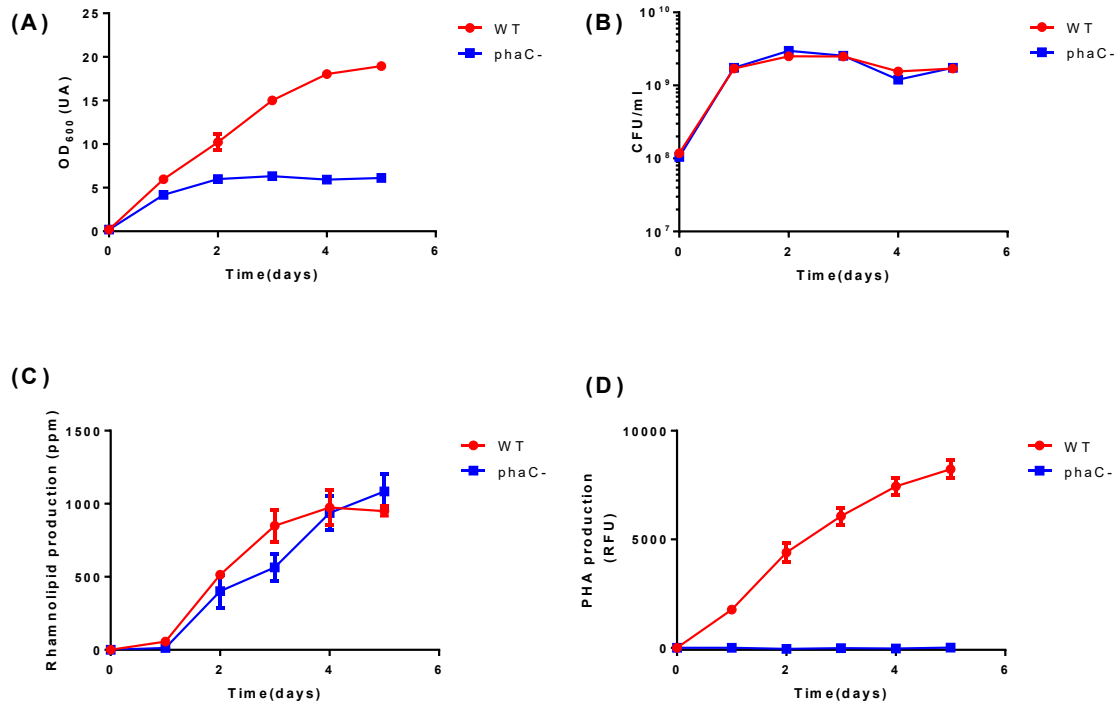


Figure 6.1: Rhamnolipid production is not increased in the *phaC*⁻ mutant compared to the wild-type strain.

Cultures were performed for the *phaC*⁻ mutant and the wild type strain E264 in NB medium supplemented with 2% glycerol during five days at 30°C. (A) OD₆₀₀ measurements, (B) CFU/mL measurements, (C) rhamnolipid quantification by LC/MS and (D) PHA production for *phaC* mutant and wild type strain E264 using Nile blue staining assays. The error bars represent standard deviation from the mean (*n* = 3 independent cultures).

We also monitored PHA production for the *rhlA1*/*rhlA2*⁻ mutant and the wild type strain E264 and found no significant difference (**Figs 6.2B** and **C**). This suggested that PHA production is not related to rhamnolipid biosynthesis under our conditions.

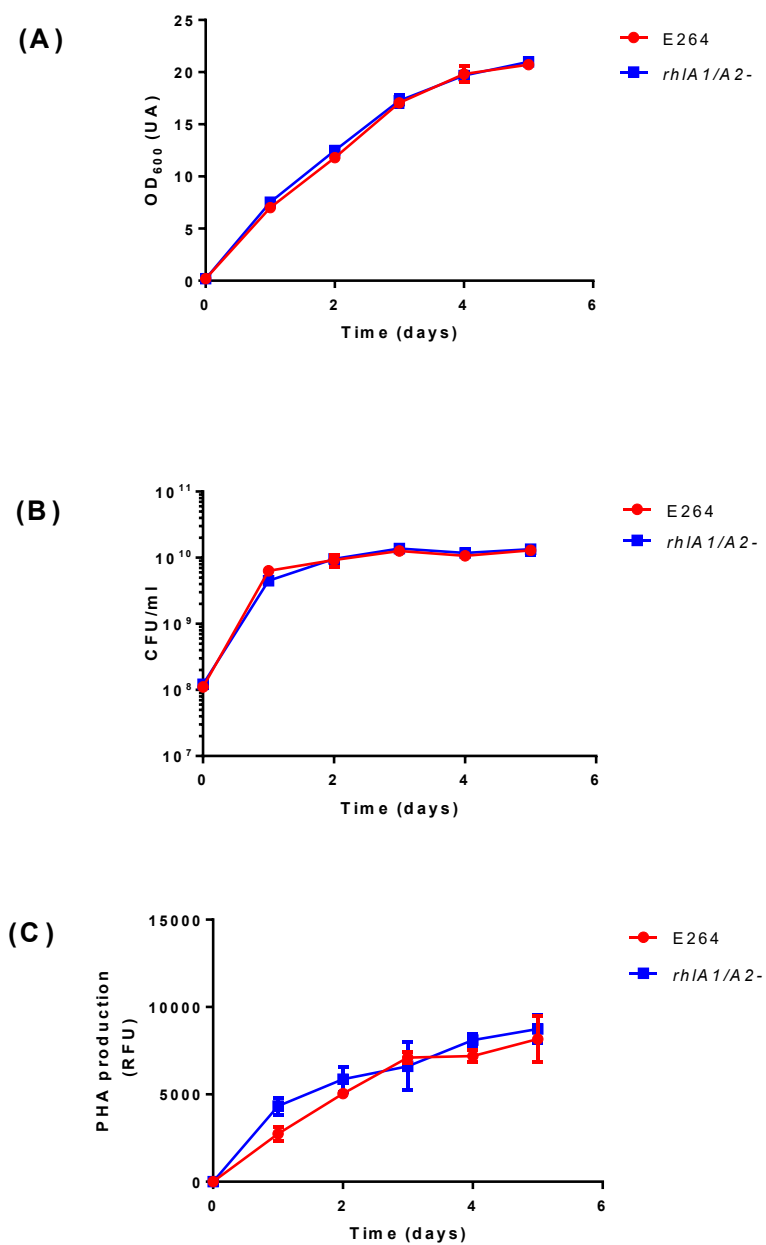


Figure 6.2: PHA biosynthesis the *rhIA1/A2* mutant and the wild type strain E264 during 5 days of culture at 30°C in NB medium supplemented with 2% glycerol.

(A) OD₆₀₀ measurements (B) CFU/mL measurements and (C) PHA production for *rhIA1/A2* mutant and wild type strain E264 using Nile blue staining assays. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures).

6.4.2 Identification of genes involved in PHA metabolism in *B. thailandensis*

In order to better understand the PHA metabolism in *B. thailandensis*, we further investigated the genome of this bacterium, looking for genes involved into the PHA regulation. We previously demonstrated that in *B. thailandensis*, the *phaC* gene, encoding for the PHA synthase, was homolog to the PHA synthase found in the *Cupriavidus* genus (**Section 2**). In *Cupriavidus necator*, other genes were reported as playing a role into the regulation of PHA production, such as *phaR*, *phaP* and *phaZ*, encoding for PhaR, PhaP and PhaZ, respectively. Interestingly, blast analyses demonstrated that each of these genes presents a high identity percentage with the ones found in the *Cupriavidus* genus (**Tableau 6.3**).

Tableau 6.3 : Identification of the genes involved in the PHA metabolism in *B. thailandensis*

Gene name	Identity percentage	Homologue in <i>B. thailandensis</i>
<i>phaR</i> (CNE_RS07145)	80.5 %	BTH_I2258
<i>phaP</i> (CNE_RS06845)	76.07 %	BTH_I1867
<i>phaZ</i> (AB017612.1)	79,74 %	BTH_I0973

6.4.3 PhaR modulates both rhamnolipid and PHA productions

The PhaR regulator is described as a repressor of the PhaP phasin, playing an important role in the early stages of PHA biosynthesis and in granule formation (York *et al.*, 2001). We decided to investigate the impact of the predicted *B. thailandensis* PhaR homologue on both PHAs and rhamnolipid biosynthesis. We cultures of the wild-type strain E264 and of a *phaR* transposon mutant were performed in NB medium supplemented with 2% glycerol (**Fig 6.3**). Interestingly, we noted that the *phaR* mutation caused an enhancement in rhamnolipid biosynthesis and a decrease in PHAs production. Indeed, at day 5, the *phaR*- mutant showed a 2.5-fold increase in rhamnolipid concentration (**Fig 6.3C**). In contrast, PHAs concentration was decreased for the *phaR* mutant (**Fig 6.3D**).

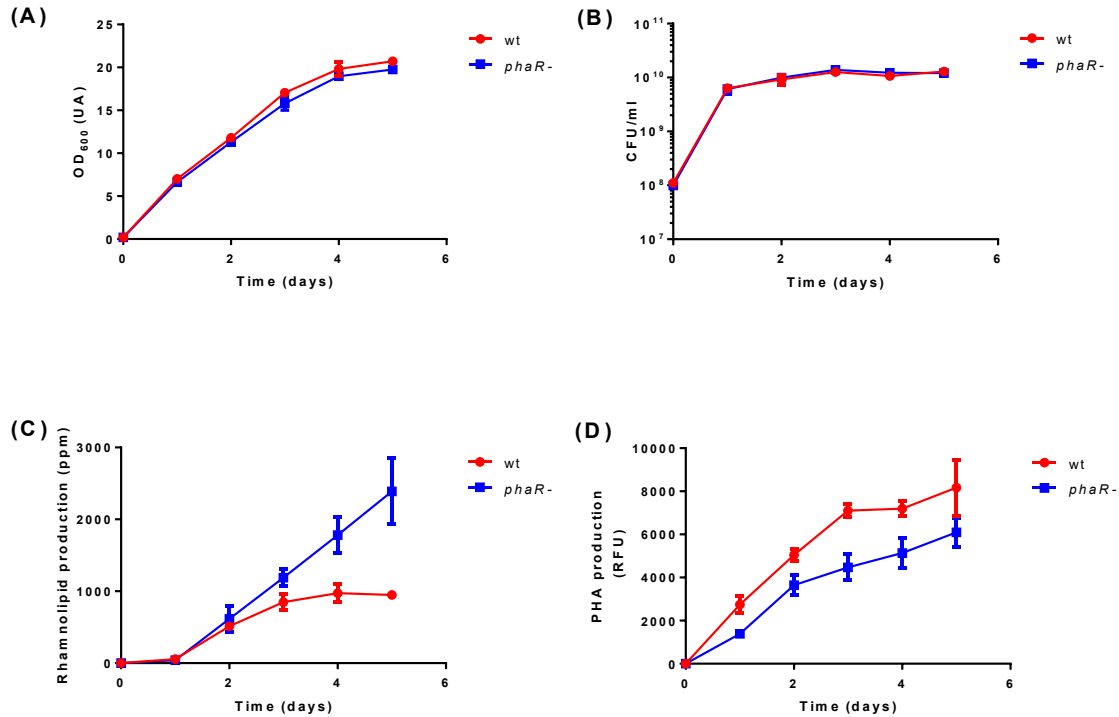


Figure 6.3: Rhamnolipid and PHA productions in the *phaR*- mutant during 5 days of culture at 30°C in NB medium supplemented with 2% glycerol.

(A) OD₆₀₀ measurements (B) CFU/mL measurements, (C) rhamnolipid production using LC/MS and (D) PHA production using Nile blue fluorescence assay. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures).

6.4.4 PhaR represses the transcription of *phaZ*

In order to better understand the role of PhaR in PHA metabolism in *B. thailandensis*, we investigated the putative targets of this regulator. Since PhaR was described as a repressor of PhaP in *C. necator* (York *et al.*, 2002), we decided to verify if it affected the transcription of the *phaP* gene using qRT-PCR. Our data demonstrated that PhaR represses the transcription of *phaP* in E264, and this was especially dramatic on day two of 3 days cultures (**Fig. 6.4A**).

Indirectly, PhaR could also be involved into *phaC* and *phaZ* regulation since it is implicated in the regulation of PHA biosynthesis in *C. necator* (York *et al.*, 2001). Also, in *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, a mutation in the *phaR* gene resulted in an overexpression of *phaC* and *phaZ* genes (Long *et al.*, 2018). We thus verified the transcription of *phaC* and *phaZ* in the wild-type strain and

in the *phaR*-mutant: *phaZ* was 20-times more transcribed in the *phaR*-mutant compared to the wild-type at day 2 (Fig. 6.4C). In contrast, PhaR did not seem to have a significant impact on the transcription of *phaC* (Fig. 6.4B).

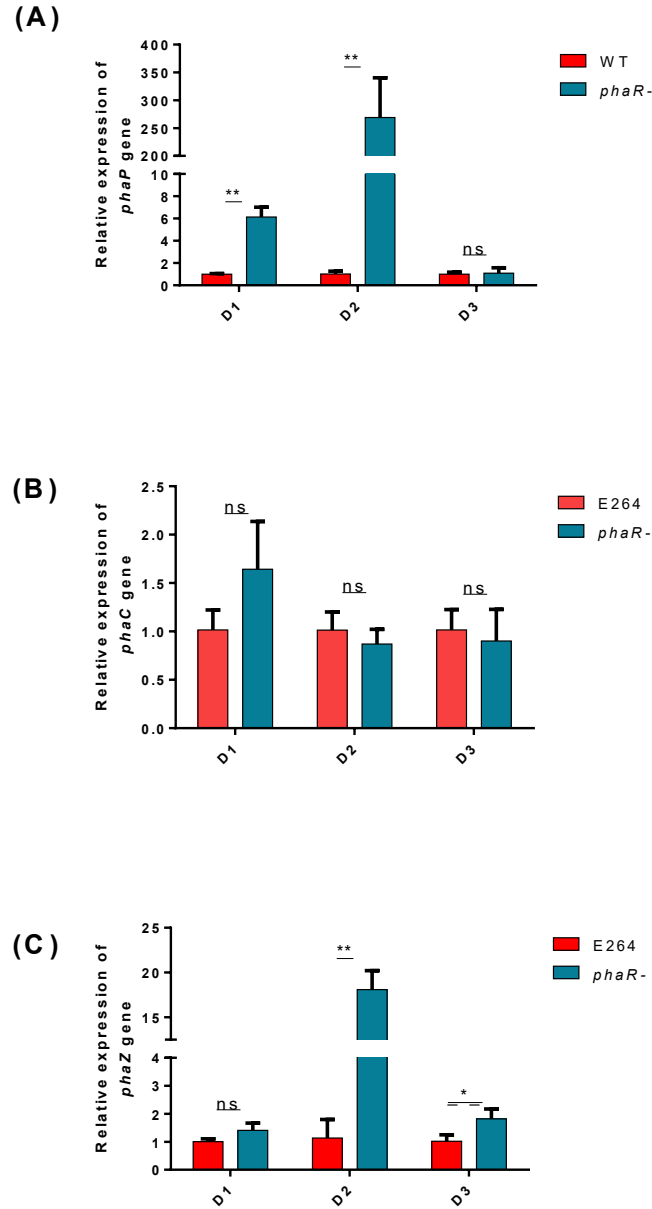


Figure 6.4: Relative expression of *phaC* and *phaZ* in *phaR* mutant compared to the wild type strain at day1, day 2 and day 3.

The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using t-test comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

6.5 Discussion and conclusion

In this study, we investigated the link between rhamnolipid and PHA production in *B. thailandensis*. We first demonstrated the presence many PHA biosynthesis and regulation genes, which presents a high percentage of identity with *C. necator*, such as *phaC*, *phaP*, *phaR* and *phaZ* (**Fig 6.5A**). Funston et al (2017) previously suggested that the biosynthesis of both rhamnolipid and PHA compete for the same precursors. Our results lead to a different conclusion. We can explain this discrepancy by the fact that their rhamnolipid and PHA concentrations were normalized based on cell dry weight. However, we demonstrated in a previous study (**Section 3**) that *B. thailandensis* produces large amounts of PHAs and that they could represent up to 75% of the weight of the cell, which rendered cell dry weight unreliable as an indicator of growth (Anderson *et al.*, 1990b). Indeed, we saw here that PHA production artificially inflates the OD measurements (Fig. 61A and B). When we normalized the rhamnolipid and PHA concentrations on CFU/mL values instead, we rather found here that PHA production was not affected by the inactivation of the *rhl* genes, and conversely, that rhamnolipid production was not affected when the production of PHA was abolished.

Like *B. thailandensis*, *P. aeruginosa* is capable of producing PHAs and rhamnolipids. PHA and rhamnolipid synthesis in *P. aeruginosa* have a close metabolic relation since (R)-3-hydroxyfatty acids are used as common precursors (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Plus, in *P. aeruginosa*, both PHAs and rhamnolipids share the same pool of R-3-hydroxyalkanoates precursors provided by the β -oxydation pathway (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). It was assumed that both biosynthesis pathways may compete for (R)-3-hydroxyfatty acid-ACP. However, (Choi *et al.*, 2011) demonstrated a higher PHA accumulation in the rhamnolipid-negative *P. aeruginosa* mutants than in the wild-type strain, while the PHA-defective mutants did not produce more rhamnolipids (Choi *et al.*, 2011). This suggested that both pathways are not directly competitive in that bacterium. Even if they seem to share many common aspects, the mechanisms relating rhamnolipids and PHAs biosynthesis are still unclear.

This study revealed an, apparently indirect, negative effect of PhaR on rhamnolipid biosynthesis. This regulator represses both the transcription of *phaP* and *phaZ*, which encode the phasin PhaP and the PHA depolymerase PhaZ (**Fig 6.5B**). In PHA producers, the production of phasins is tightly coupled to PHA synthesis (Wieczorek *et al.*, 1995). Plus, PhaP deletion mutants exhibit reduced PHB production in *C. necator* (Kuchta *et al.*, 2007); in contrast, upregulation of phasins in the *B. thailandensis* *phaR* mutant led to a decrease in PHA biosynthesis under our conditions. Interestingly, in *X. oryzae* pv. *oryzae*, a mutation in the *phaR* gene resulted in an

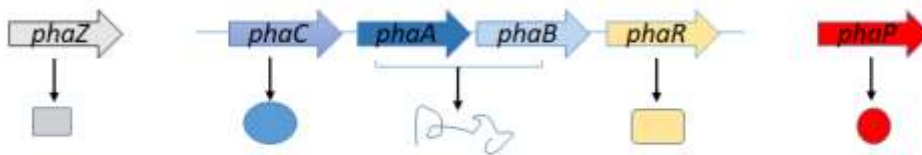
higher transcription of both *phaZ* and *phaC* genes than for the wild-type strain (Long *et al.*, 2018). Since PhaZ is predicted to be a PHA depolymerase, we hypothesize that the observed higher rhamnolipid production in the *phaR*- mutant could be due to higher degradation of PHA by PhaZ (**Fig 6.5C**). In this way, the obtained fatty acids could be used as precursors for the hydroxyalkanoxyloxy-alkanoic acid (HAA) synthesis by RhIA, as suggested in a study on *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014)

In *B. thailandensis* cultures, for both wild-type and the *phaR*- mutant, PHA production started at the beginning of the growth curve while the rhamnolipid production started only from the second day of cultivation. This lag could be explained by a limitation in HAA precursors. To investigate that possibility, we looked at the rhamnolipid biosynthesis pathway. Rhamnolipid synthesis relies on two pathways: the *de novo* fatty acid synthesis and the rhamnose pathway, which provide the required precursors HAA and (dTDP)-rhamnose, respectively. Indeed, in *B. thailandensis*, the *de novo* fatty acid synthesis was reported to provide the R-3-hydroxyacyl-ACP (Irorere *et al.*, 2018) and glucose-6-phosphate is used for rhamnose synthesis. However, in *P. aeruginosa*, the identification of the pathway providing the precursors for the RhIA enzyme is still unclear. Various models have been described (**Section 1.2.4.2**)(Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014, Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2019, Lin Zhang *et al.*, 2012), in which either the β -oxydation or the FAS II pathway are described as the main provider of R3-hydroxyacyl activated in CoA or ACP. We suggest here that another mechanism could be involved into the lipid precursors supply, based on the PHA depolymerization. Several mechanisms are involved in this process: either the thiolysis (using CoA as a co-substrate) or the hydrolysis of the PHA in HA-CoA or HA, respectively (Brigham *et al.*, 2012). BLAST analyses for BTH_I0973, the depolymerase studied here, found homologies with a *phaZ1* depolymerase, an enzyme involved in PHA degradation by thiolysis (Uchino *et al.*, 2007). The thiolysis reaction allows the liberation of a HA-CoA (Uchino *et al.*, 2007), usually obtained by the β -oxydation way. This observation suggests that RhIA is able to use HA-CoA as a substrate in *B. thailandensis*.

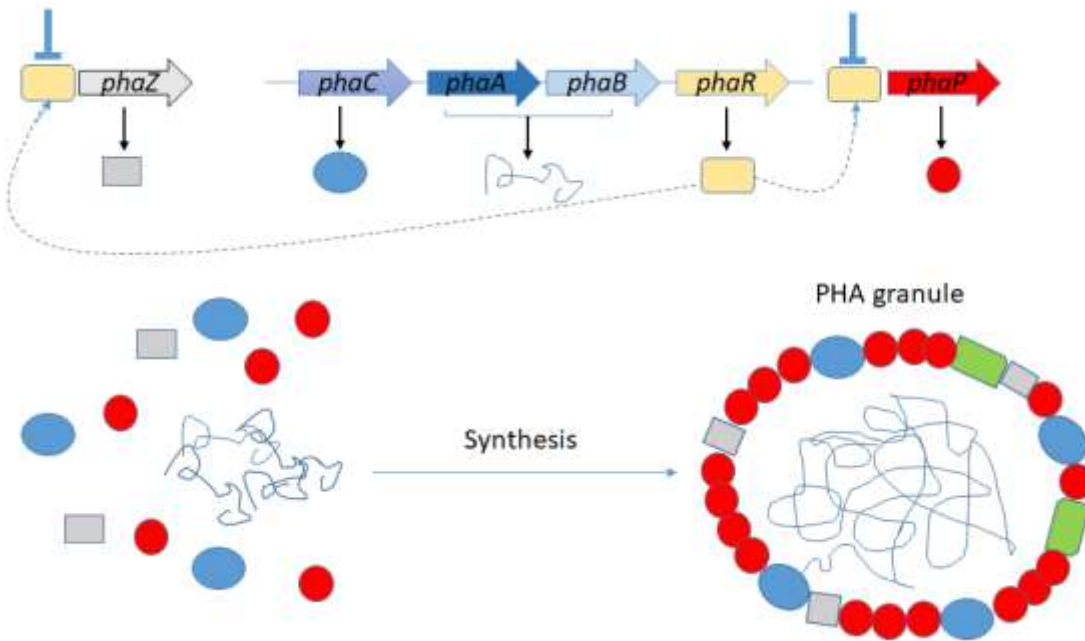
A part of the rhamnolipid biosynthesis would be subsequent to both PHA biosynthesis and depolymerisation, explaining the delay we observe before the start of rhamnolipid biosynthesis compared to the one of PHAs. A recent study described *B. thailandensis* as a co-producer of rhamnolipid and PHA when cultured on used cooked oil (Kourmentza *et al.*, 2018). In accordance with our hypothesis, results suggested that the production of rhamnolipid could be promoted by PHA depolymerization, representing a switch in carbon balance (Kourmentza *et al.*, 2018). However contrary to the speculations of (Kourmentza *et al.*, 2018), in which this switch in carbon

metabolism would take place in the absence of an extracellular carbon source, our conditions revealed that the degradation is effective during the logarithmic phase, meaning when carbon is still available. Accordingly, in *P. putida* the simultaneous accumulation and degradation of PHA was shown, indicating a potential regulatory mechanism to control fatty acid flux through the β -oxidation pathway (Ren *et al.*, 2009). This mechanism would contribute to the rhamnolipid production enhancement and could prevent a too important biosynthesis of PHA and so regulate the polymer biosynthesis.

(A) Gene organisation for PHA biosynthesis regulation and produced molecules



(B) Model for PHA biosynthesis regulation in the wild type strain under permissive conditions



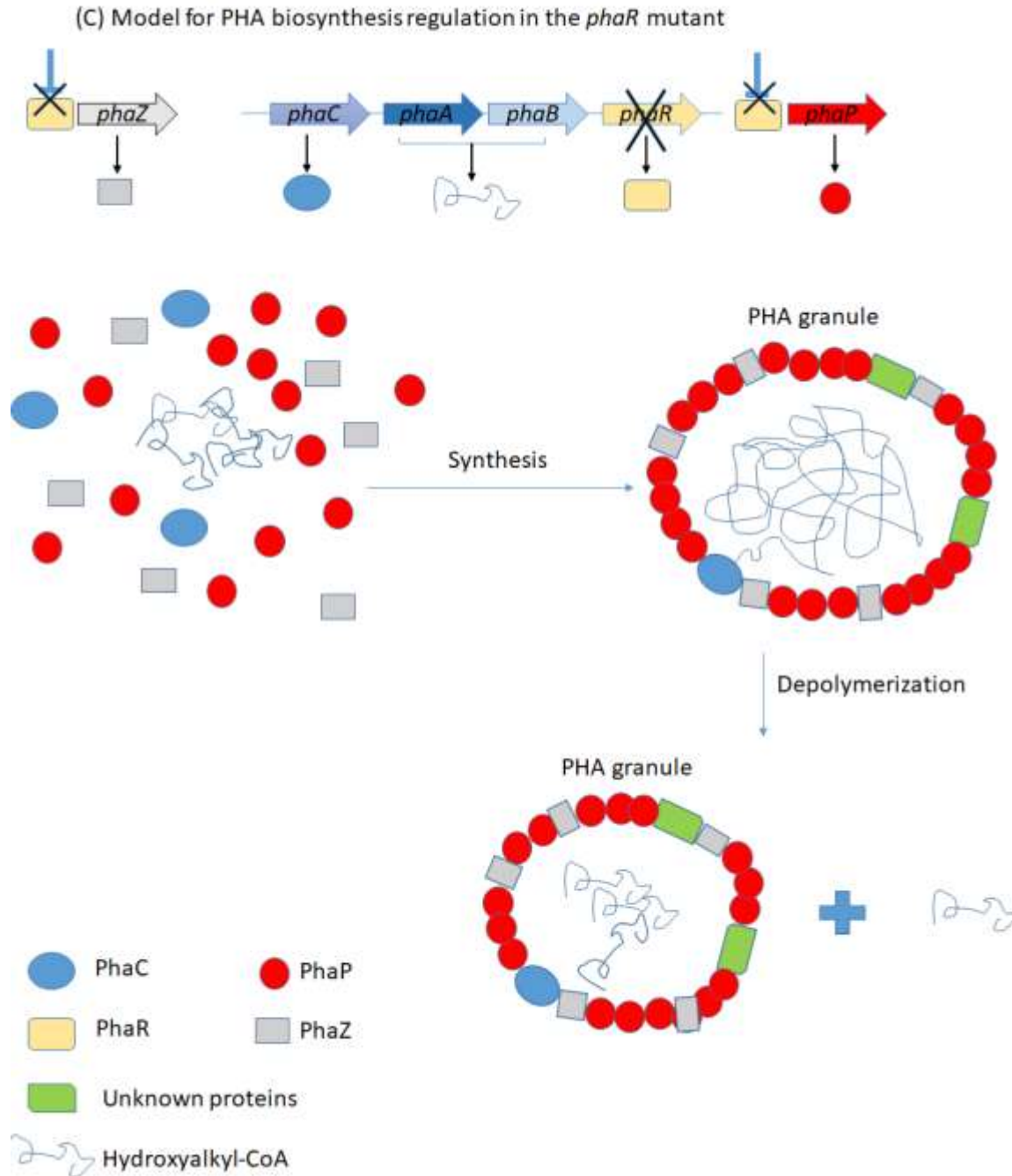


Figure 6.5 : Hypothetical model for PHA biosynthesis in *B. thailandensis* for the wild-type strain and the *phaR*- mutant.

(A) Genetic organization of the genes involved in the PHA biosynthesis, (B) hypothetical model for PHA biosynthesis in the wild-type strain, (C) hypothetical model for PHA biosynthesis in the *phaR*-mutant. The same kind of model was proposed in *Paracoccus denitrificans* (Maehara *et al.*, 2002).

Of note, rhamnolipid production was not affected in a *phaC*- defective strain and PHA production was not increased in the rhamnolipid-null mutant neither, indicating that a possible

PHA depolymerisation by PhaZ is not the only mechanism involved in rhamnolipid biosynthesis. However, we can hypothesize that the higher availability in HAA precursors enhances of the RhIB activity, since the HAA are a substrate of this enzyme.

In conclusion, we demonstrated here that rhamnolipid and PHA productions are not directly linked and thus reducing PHA production will not lead to an enhancement of rhamnolipid concentrations. In the same way, the disruption of the rhamnolipid pathway will not affect the PHA biosynthesis. However, our work also highlighted PhaR as a regulator involved in rhamnolipid biosynthesis. Both PHA and rhamnolipid biosynthesis are cross-regulated because it appears that the PHA depolymerisation is involved into the rhamnolipid production as previously suggested in (Kourmentza *et al.*, 2018). Finally, a metabolic engineering strategy could be employed by deleting the *phaR* gene in order to obtain a rhamnolipid overproducing strain.

6.6 Funding informations

This work was supported by Discovery grant No. RGPIN-2015-03931 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SM was recipient of a Ph.D. scholarship awarded by the Fondation Armand-Frappier..ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

6.7 Acknowledgements

Thanks to Marie-Christine Groleau for insightful comments and reviewing the article.

6.8 Présentation des résultats additionnels de l'article

La plupart des expériences présentées dans l'article ont également été réalisées dans le milieu minimal non optimisé décrit dans le **Chapitre 8 (Section 8.3.3)** afin de vérifier si les résultats observés étaient propres au milieu NB complémenté avec 2% de glycérol. Des cultures en fioles de 125 mL, contenant 25 mL de milieu de culture minimal ont étéensemencées à $DO_{600} = 0.2$ et incubées pendant 12 jours à 30°C. La durée des cultures a été allongée par rapport à celles réalisées en milieu NB du fait de la phase de latence plus longue en milieu minimal. Des échantillons ont été prélevés tous les deux jours afin d'évaluer la croissance bactérienne et la production de rhamnolipides.

De plus, outre le gène *phaC* précédemment découvert (Funston et al., 2017) (note PHA), nous avons également identifié des gènes homologues aux gènes *phaA* et *phaB* de *C. necator* chez *B. thailandensis*. En effet, le gène *phaA* de *C. necator* (CP002877) présente un pourcentage d'identité de 82% avec le gène BTH_I2256 retrouvé chez *B. thailandensis*. De même, le gène *phaB* de *C. necator* (FJ897462.1) est retrouvé chez *B. thailandensis* sous le locus BTH_I2257 avec un pourcentage d'identité de 83%.

Nous avons obtenu des mutants où ces deux gènes ont été inactivés grâce à la banque de mutants existant pour *B. thailandensis* (Gallagher et al., 2013) (**Tableau 6.4**).

Tableau 6.4 : Souches supplémentaires utilisées pour cette étude

Souche	Caractéristiques	Références
<i>phaA</i> BT00306	E264 BTH_2256-190:: ISlacZ Prha-Bo, tp/FRT, Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
<i>phaB</i> BT03952	E264 BTH_2257-116:: ISlacZ Prha-Bo, tp/FRT, Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)

Tp : trimethoprim

6.8.1 La production de rhamnolipides est diminuée chez les mutants des gènes codant la biosynthèse des PHAs en milieu minimal

Dans ce milieu de culture, au contraire de ce qui a été vu dans le milieu de culture non-défini riche (**Fig.6.1**), l'inactivation du gène codant pour l'homologues de l'enzyme PhaC, responsable de la synthèse des PHA, résulte en une diminution de la production de rhamnolipides. En effet, à croissance égale (**Fig. 6.6A**), les mutants des gènes de la biosynthèse des PHAs produisent moins de rhamnolipides que la souche sauvage, respectivement (**Fig. 6.6B**). Le même constat peut être fait pour les mutants des gènes homologues à *phaA* et *phaB*, qui codent pour la synthèse des différents intermédiaires des PHAs, et qui ont été étudiés en milieu minimal. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse des rhamnolipides serait dépendante de celle des PHA, du moins en partie, puisqu'elle n'est pas totalement abolie dans les mutants *phaA*-, *phaB*- et *phaC*-.

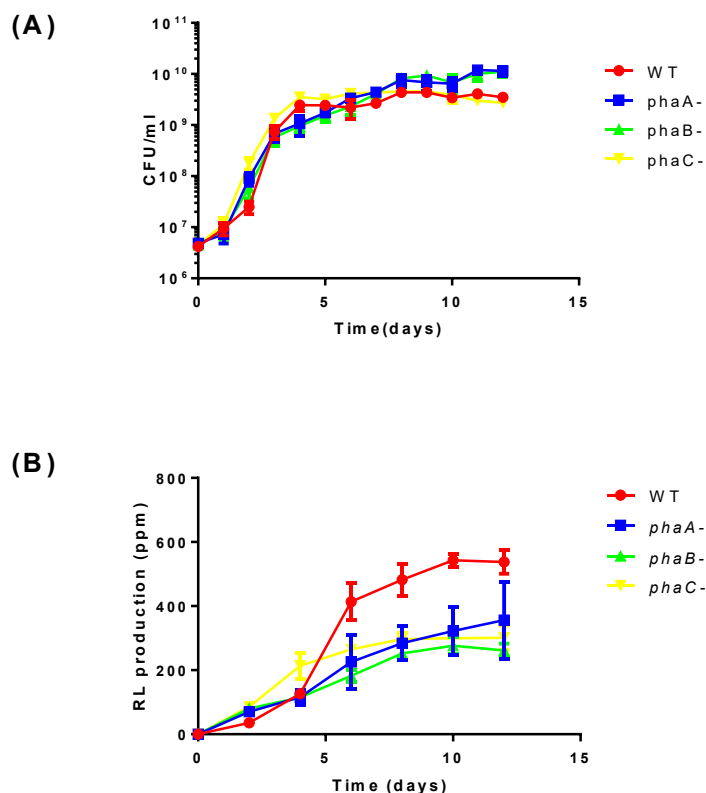


Figure 6.6 : Les mutants des gènes codant pour la biosynthèse des PHA produisent moins de rhamnolipides que la souche sauvage E264.

Les cultures ont été réalisées en trois réplicats en milieu minimal durant 12 jours. La croissance a été évaluée par dénombrement cellulaire (A). La production de rhamnolipide a été mesurée par LC/MS (B). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

6.8.2 La production de rhamnolipides est augmentée chez le mutant *phaR*- en milieu minimal

Comme décrit à la **section 6.4.3**, nous avons également étudié le mutant du régulateur *phaR*. Une surproduction de rhamnolipides avait été observée alors que la biosynthèse des PHA avait été réduite (**Fig. 6.3**). Nous avons vérifié cette information en milieu minimal et les résultats ont convergé vers la même conclusion. En effet, les cultures réalisées pendant 12 jours en milieu minimal ont permis d'obtenir une accumulation supérieure de rhamnolipides pour le mutant *phaR*- (**Fig 6.7**), confirmant les résultats obtenus en milieu NB. La productivité de la souche *phaR*- est

plus élevée que celle de la souche sauvage pendant la phase exponentielle de croissance. Cependant, la productivité en phase stationnaire est la même pour les deux souches (**Fig, 6.7 C**), suggérant que l'augmentation de la production observée (**Fig 6.7 B**) serait liée à l'augmentation de la population bactérienne (**Fig 6.7 A**).

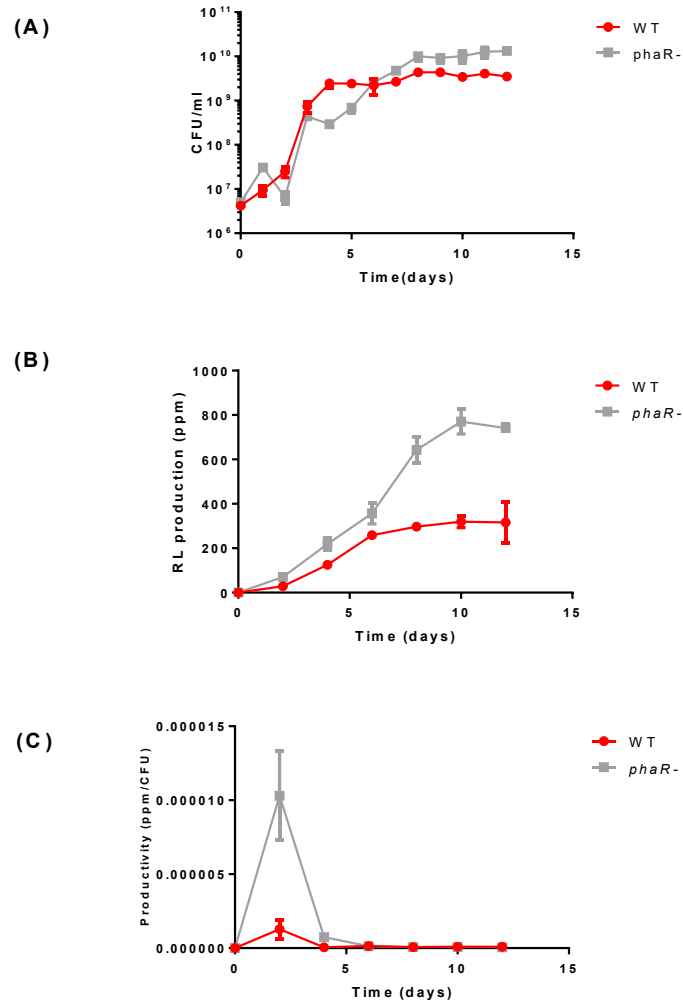


Figure 6.7: Le mutant du gène codant pour le régulateur PhaR produit plus de rhamnolipides que la souche sauvage E264.

Les cultures ont été réalisées en trois réplicats en milieu minimal durant 12 jours. La croissance a été évaluée par dénombrement cellulaire (A). La production de rhamnolipide a été mesurée par LC/MS (B). La productivité (ppm/cfu) a été calculée (C). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Ces expériences n'ayant été réalisées qu'une seule fois, il faudra les répéter afin de confirmer les observations faites ici.

6.8.3 La dépolymérisation des PHAs contribue à la production des rhamnolipides en milieu minimal

Afin de mieux comprendre la relation entre la production de rhamnolipides et celle des PHAs, nous avons réalisé des cultures visant à comparer le mutant *phaZ*- à la souche sauvage. Le gène *phaZ* coderait pour une PHA dépolymérase et comme mentionné à la **section 6.4.4**, celui-ci serait surexprimé dans le mutant *phaR*- au profit d'une surproduction de rhamnolipides. Bien que la surexpression du gène *phaZ* n'ait pas encore été vérifiée chez le mutant *phaR* en milieu NB, nous supposons que cette observation reste valide en milieu minimal. L'hypothèse ici serait donc que la surproduction de rhamnolipide observée chez le mutant *phaR*- est reliée à celle des PHA *via* la dépolymérisation de ceux-ci, rendant disponible des substrats nécessaires à la synthèse des précurseurs des rhamnolipides.

Le mutant *phaZ*- a donc été cultivé en milieu minimal et la production de rhamnolipides a été comparée avec celle obtenue par la souche sauvage E264. Les résultats ont révélé qu'à croissance équivalente, le mutant *phaZ*- produit environ deux fois moins de rhamnolipides que la souche sauvage, suggérant que la dépolymérisation des PHAs serait un procédé favorable à la biosynthèse des rhamnolipides (**Fig 6.8**). Une étude visant à caractériser la production de PHA dans le mutant *phaZ*- devrait être envisagée, de façon à confirmer une plus grande quantité de PHA dans ce mutant, qui expliquerait que ceux-ci n'ont pas été dégradés au profit de la production de rhamnolipides.

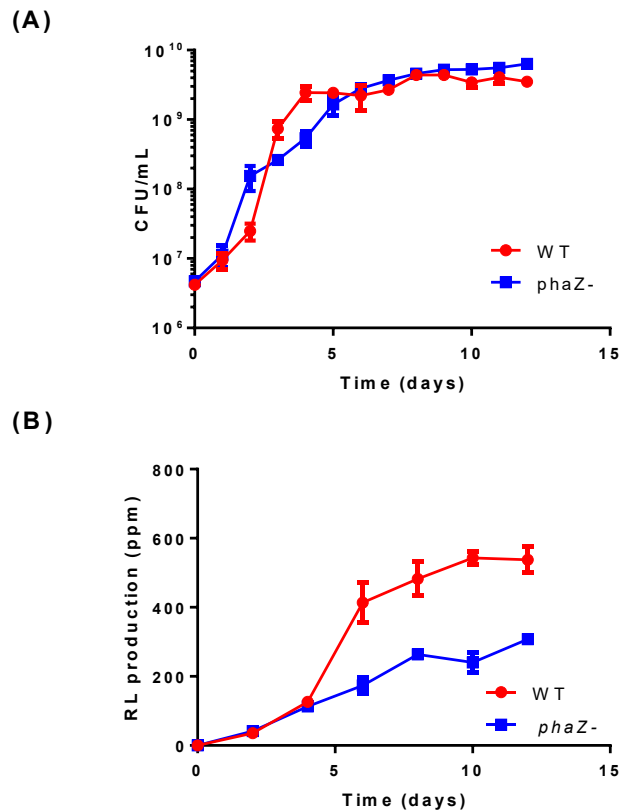


Figure 6.8 : Le mutant du gène codant pour la dépolymérase PhaZ produit moins de rhamnolipides que la souche sauvage E264.

Les cultures ont été réalisées en trois réplicats en milieu minimal durant 12 jours. La croissance a été évaluée par dénombrement cellulaire (A). La production de rhamnolipide a été mesurée par LC/MS (B). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

6.8.4 Conclusions et perspectives.

Cet article a permis de mettre en évidence un régulateur affectant la biosynthèse des rhamnolipides : PhaR. Les résultats recueillis soulignent l'étroite relation entre la biosynthèse des rhamnolipides et celle des PHAs : bien que non compétitives, la première serait en partie dépendante de la seconde.

Afin de vérifier les hypothèses mentionnées dans ce chapitre, il sera important de réaliser des expériences complémentaires. Dans un premier temps, les cultures du mutant *phaZ* en milieu NB devront être réalisées pour valider les données obtenues en milieu minimal. De plus, il serait intéressant d'évaluer les niveaux d'expression des deux opérons *rhlA1* et *rhlA2* dans les mutants

phaR- et *phaZ*-, afin de déterminer si la plus grande production de rhamnolipides observée dépend effectivement d'une plus grande disponibilité en précurseurs métaboliques et/ou si ces mutations impliquent des changements au niveau transcriptionnel.

Il est important de noter que les PHAs produits par *B. thailandensis* décrits dans la littérature sont des PHB, pour polhydroxybutyrates, correspondant à des PHAs à chaînes courtes, avec 4 atomes carbonés (Kourmentza *et al.*, 2018). Ceci est cohérent avec la machinerie génétique retrouvés chez cette bactérie, qui est homologue à celle présente chez *C. necator*, qui est connu pour produire lui aussi des PHB (**Section 2**). Les rhamnolipides principalement produits par *B. thailandensis* sont les Rha-Rha-C14-C14, signifiant que la chaîne lipidique dont ils sont constitués comporte 14 atomes de carbone. Il conviendra alors d'investiguer plus en détails comment les acides gras relâchés par la dépolymérisation des PHAs, à 4 atomes de carbonés donc, contribuent à l'augmentation de la production des rhamnolipides dont la chaîne carbonée comprend 14 atomes de carbone.

Aussi, il serait également intéressant de vérifier l'impact de la dépolymérisation des PHAs sur la biosynthèse des rhamnolipides à chaînes plus courtes.

7 PRESENTATION DE L'ARTICLE 5

Quorum sensing 3 system negatively regulates rhamnolipid production and favours polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Burkholderia thailandensis*

Le système de quorum sensing 3 inhibe la production des rhamnolipides et favorise la biosynthèse des polyhydroxyalcanoates chez *Burkholderia thailandensis*

Auteurs :

Sarah Martinez et Eric Déziel

INRS - Institut Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Laval, Québec, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Non-soumis

Contribution des auteurs :

SM : planification du design expérimental, réalisation des expérimentations, rédaction du manuscrit

ED : planification du design expérimental, rédaction du manuscrit.

Nous avons précédemment démontré que le régulateur ScmR jouait un rôle dans la production des rhamnolipides et des PHAs. Ce régulateur serait d'ailleurs connu pour moduler le quorum sensing. Cependant, des résultats non publiés à ce jour suggèrent, dans des conditions différentes de celles que nous utilisons pour la production de rhamnolipides, que ScmR serait au contraire contrôlé par le *quorum sensing*. De plus, une récente étude publiée pendant la rédaction

de ce travail, rapporte que le QS pourrait représenter une cible pour moduler la production des rhamnolipides et des PHAs, confirmant nos premiers résultats. Nous avons donc décidé d'étudier plus en profondeur l'effet du *quorum sensing* sur la production des rhamnolipides et des PHAs ainsi que la relation qu'il pourrait y avoir entre ScmR et le QS dans nos conditions de culture.

7.1 Abstract

Burkholderia thailandensis is a non-pathogenic bacterium able to produce both rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates, potentially valuable bioproducts. This bacterium thus represents an interesting candidate for the implementation of commercial bioprocesses. Unfortunately, for now, the production yields are insufficient. Quorum sensing is a global regulatory mechanism of gene expression depending on bacterial density. *B. thailandensis* harbors three inter-related quorum sensing systems. We specifically identified the BtaI3/BtaR3 system as involved in a rhamnolipid overproducer phenotype, together with a decrease in PHA biosynthesis. We also demonstrate that quorum sensing activates the ScmR transcriptional regulator of secondary metabolites, previously shown to repress rhamnolipid production and to activate the PHA biosynthesis. However, this regulator is not solely regulated by quorum sensing, suggesting that a cumulative inactivation of both quorum sensing and *scmR* could represent a very promising strategy for engineering an optimized rhamnolipid-producing strain.

7.2 Introduction

Burkholderia thailandensis is a soil saprophyte bacterium reported for its abilities to produce both rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate (PHA) (Dubeau *et al.*, 2009, Funston *et al.*, 2017). These two metabolites present industrial interest since they could be an ecological alternative to surfactants and plastics derived from the petrochemical industry, respectively. Indeed rhamnolipids constitute a promising biosurfactants with better properties (efficiency, biodegradability...) than their synthetic counterparts. On the other hand, PHAs are biosourced plastics, which are biodegradable and so could find many applications in food packaging for instance. Unfortunately, the costs related to the production and the purification of both rhamnolipid and PHAs are higher than the current commercialized surfactant and plastics, explaining why their market shares are low (Sekhon Randhawa *et al.*, 2014). In this context, optimization the production of both rhamnolipid and PHAs is a major challenge. Finding new regulators for their biosynthesis therefore could be helpful for a better understanding of the mechanisms related to their production.

The structure of the lipidic moiety of rhamnolipid and PHA is similar. Indeed, they both harbor a fatty acid component, corresponding to either the hydrophobic apolar tail or the monomeric unit respectively, and suggesting that rhamnolipids and PHAs could compete for the same precursors (Funston *et al.*, 2017). That is why these two metabolites are often studied together in *P. aeruginosa*, another bacterium reported as a rhamnolipid and PHAs. However, various models are coming into conflict with one another for the identification of the metabolic pathway providing their common precursor in *P. aeruginosa* (**Section 1.2**). In *B. thailandensis*, the fatty acid synthesis pathway was recently reported as the main provider of lipid precursors for rhamnolipid production (Irorere *et al.*, 2018).

Quorum sensing (QS) is a global regulatory mechanism of gene expression depending on bacterial density (Fuqua *et al.*, 1994). The first LuxI/LuxR system was initially identified in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri* (Neelson *et al.*, 1970). Most of Gram-negative bacteria harbor homologues of this specific system. Briefly, the LuxI-type synthases are responsible for the production of the signaling molecules N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), which accumulate in the environment during the bacterial growth until a threshold concentration. Then, the LuxR-type transcriptional regulators are activated by the AHLs, allowing the modulation of the expression of QS target genes. The promoting region of these genes often contain a *lux* box sequence (Clay Fuqua *et al.*, 2002). By this way, bacteria are able to synchronize their activities and act as multicellular communities in order to realize some functions. Among the QS controlled processes which are documented, we can quote bioluminescence, secretion of virulence factor as antibiotics or biofilm formation (Bassler *et al.*, 2006, Papenfort *et al.*, 2016). In *B. thailandensis*, the QS systems are referred to as the BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3) systems (Charlotte D Majerczyk *et al.*, 2013), mainly associated with C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL respectively (Chandler *et al.*, 2009). QS regulates the production of many functions such as auto-aggregation, antibiotics and other secondary metabolites production (Chandler *et al.*, 2009). These QS systems are intricately intertwined in a homeostatic interaction (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Although a relationship between QS and the biosynthesis of rhamnolipids has been previously noted (Irorere U *et al.*, 2019, C Majerczyk *et al.*, 2014a), there is very limited information available on which QS system is implicated.

In addition, we previously identified ScmR as a regulator of the production of both rhamnolipids and PHAs (**Section 3**). This regulator was also reported to be QS-controlled (Mao *et al.*, 2017), based on the results obtained in recent RNA-seq studies (C Majerczyk *et al.*, 2014a, C Majerczyk *et al.*, 2014b).

The aim of our study was to further investigate the modulation of the biosynthesis of PHA and rhamnolipids by QS in *B. thailandensis*.

7.3 Materials and methods

7.3.1 Bacterial strain and plasmids:

Strains were stored in 15% glycerol at -80°C and plasmids were stored in -20°C.

Strains used in this study are presented in **Table 7.1**.

Tableau 7.1 : Strains used in this study

Strains	Characteristic	Reference
<i>B. thailandensis</i> E264	Wild type	(Paul J Brett <i>et al.</i> , 1998)
ED844	E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED867	E264 $\Delta btaR1$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED843	E264 $\Delta btaR2$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED868	E264 $\Delta btaR3$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED865	E264 $\Delta btaI1$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED841	E264 $\Delta btaI2$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED866	E264 $\Delta btaI3$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)

7.3.2 Culture conditions:

Strains were routinely grown from frozen stocks in tryptic soy broth (TSB) (BD) at 37°C and 150 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. For rhamnolipid production, nutrient broth (NB) medium (BD Difco, Mississauga, ON, Canada)

supplemented with 4% (w/v) glycerol was used. Cultures were grown at 37°C with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada). For experiments with AHL complementation, 2 µM C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL (Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON, Canada) were added to cultures. AHLs stocks were prepared in HPLC-grade acetonitrile. Acetonitrile only was added to the controls. All experiments were performed in triplicates.

7.3.3 Rhamnolipid quantification:

The rhamnolipid concentration in the various bacterial cultures after 6 days of growth was determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry as previously described (**Section 4**).

7.3.4 PHA biosynthesis measurement by fluorescence:

PHA accumulation was measured as described previously (**Section 3**).

7.3.5 Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) experiments:

RNA extractions and qRT-PCR were performed as previously described (**Section 5**).

Tableau 7.2: Primers used for qRT-PCR

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5'to 3')	Reference
<i>scmR</i>	SLG_qRThmqR_F	CTTCGTATGTGTTGCCGAAC	(Le Guillouzer, 2018)
	SLG_qRThmqR_R	ATGAGACGCGTGTTTCAGATG	
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F	ACCAGGGCGAATTGATCTC	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
	SLG_qRT-PCR_ndh_R	GATGACGAGCGTGTCGTATT	

7.3.6 Transmission electron microscopy (TEM) for visualisation of PHA granules:

TEM analysis were performed as previously described (**Section 3**).

7.4 Results

7.4.1 QS controls the production of both rhamnolipid and PHA.

Since QS depends on the accumulation of AHL signals, we first investigated the production of rhamnolipid in an AHL-defective $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant compared to the WT. Because rhamnolipid production and PHA production are closely related, we also measured PHA production in both strains.

When using OD_{600} measurements, we observed a growth defect for the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant when compared to the wild type. Indeed, the WT and the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant achieved a maximum OD_{600} of 22.56 and 13.9 respectively (**Fig. 7.1A**). However, since we showed that OD_{600} is not a valuable indicator of growth in PHA producing conditions (**Section 3**), we performed cell counts (CFU/mL) as well. Our CFU counts showed that growth was actually similar between both strains. However, there seemed to be cell mortality in the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant after five days of culture (**Fig. 7.1B**). This observation was consistent with Irorere et al (2019) since their study demonstrated that the QS mutant presented a cell mortality starting at 96h. Rhamnolipid production was two times higher for the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant than for the WT. This difference rose to almost three times after 5 days where the rhamnolipid production in the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant reached 1.7 g/L with a concentration of only 0.77 g/L for the WT (**Fig. 7.1C**). Nile Blue staining showed that the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant produced less than twice PHAs compared to the WT (**Fig. 7.1D**). This observation was confirmed by TEM images realized from samples at day 4. Pictures are presented in **Figure 7.1E** and **7.1F**.

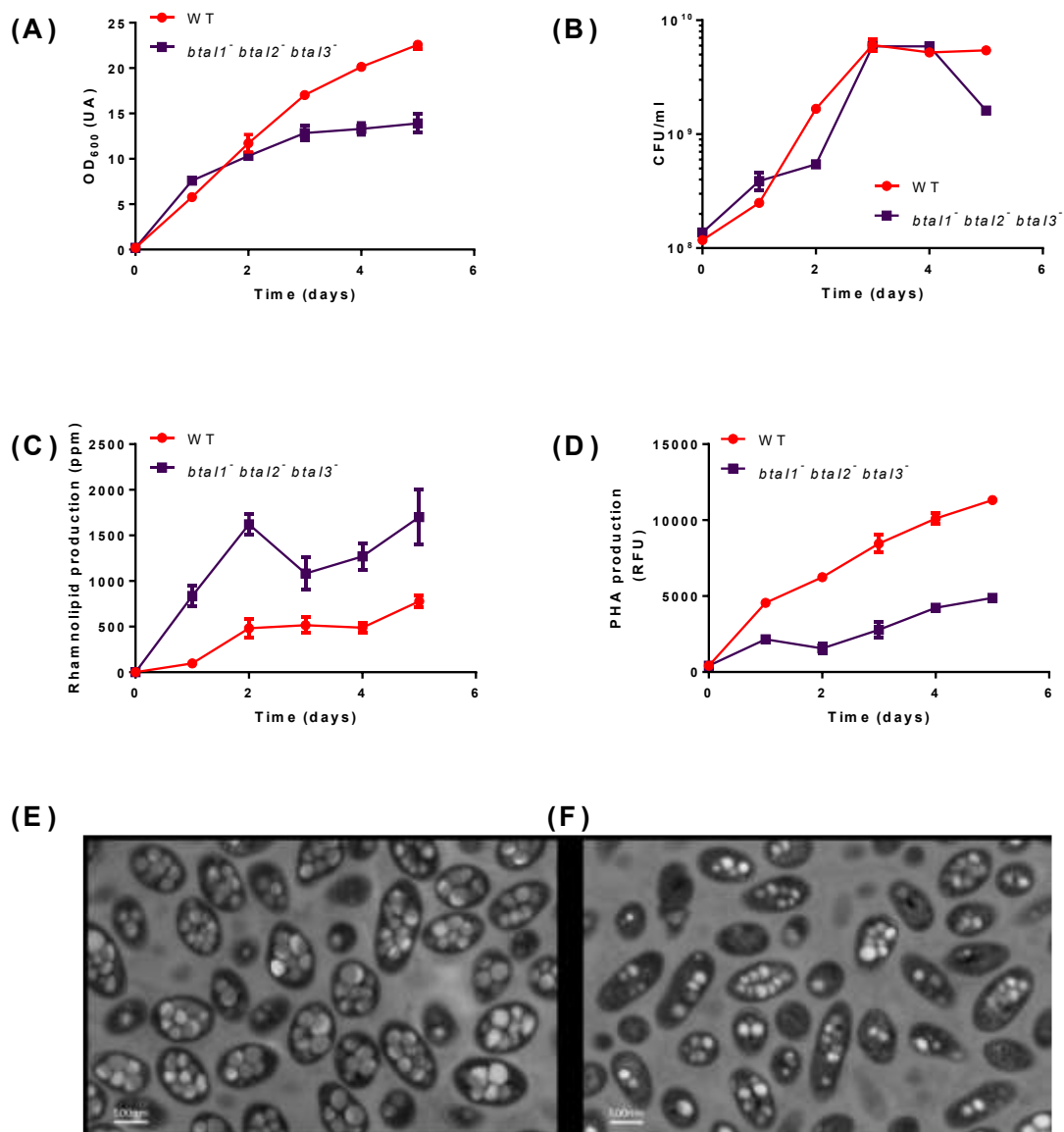


Figure 7.1 : Rhamnolipid and PHA production are QS-controlled.

The wild type strain and the $\Delta bta1 \Delta bta2 \Delta bta3$ mutant were cultured during five days at 30°C in NB medium supplemented with 2% glycerol. The OD₆₀₀, CFU/mL, PHA production and rhamnolipid production measurements are represented in (A), (B), (C) and (D) respectively. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates. TEM images were taken at day 4 for the wild type strain (E) and the $\Delta bta1 \Delta bta2 \Delta bta3$ mutant (F).

7.4.2 The QS-3 system is a repressor of rhamnolipid biosynthesis.

Knowing that QS apparently generally downregulates rhamnolipid production, we then sought to identify which of the three QS system is more implicated in the regulation of rhamnolipid

production in E264, we measured concentrations in cultures of individual *btaI* and *btaR* mutants after 5 days. We again investigated the production of PHA as well in the same background. No difference was observed in final rhamnolipid levels when we compared the *btaI1-*, *btaI2-* or *btaR1-*, *btaR2-* mutants to the wild type strain E264. In contrast, rhamnolipid concentrations were increased when *btaI3* or *btaR3* were inactivated. Indeed, we measured a rhamnolipid production of 1304 ppm and 1338 ppm in the *btaI3-* and *btaR3-* mutants respectively, while the wild type strain E264 produced 743 ppm, meaning a 1.7-times rhamnolipid overproduction (**Figs 7.2A and 7.2C**).

Similarly, no significant difference in PHA biosynthesis was observed for *btaI1-*, *btaI2-* or *btaR1-* and *btaR2-* mutants (**Figs 7.2B and 7.2D**), although we measured slightly less PHAs in the *btaR1* mutant. However, the QS-3 system mutants presented a defect in PHA production.

Based on these observations, we can conclude that the QS-3 system acts as a repressor of rhamnolipid production and activator of PHA biosynthesis.

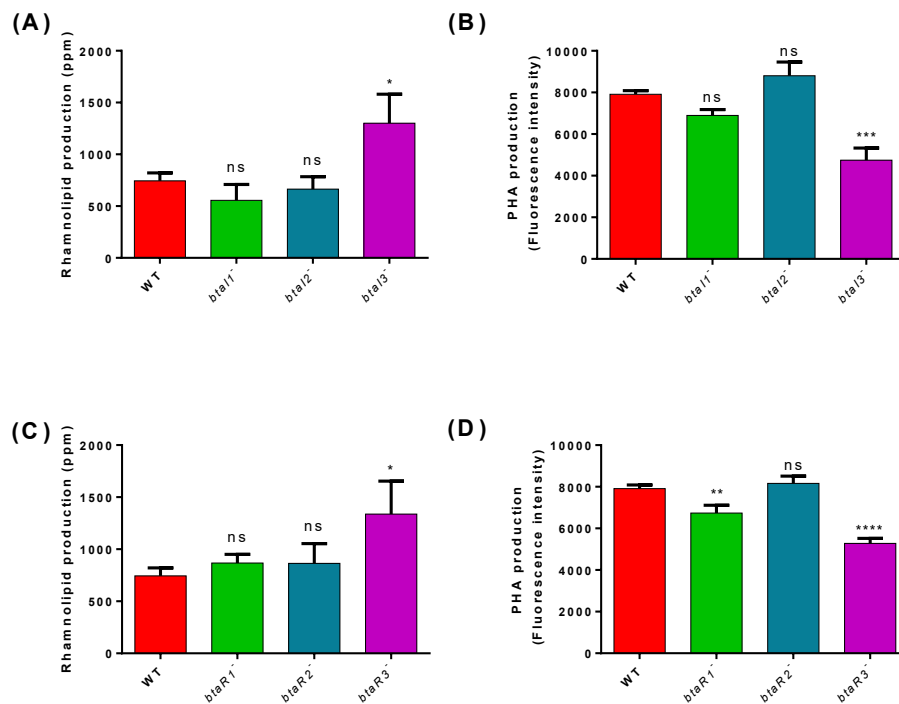


Figure 7.2 : The QS-3 affects both PHA and rhamnolipid productions.

Rhamnolipid and PHA productions are presented for *btaI-* mutants in (A) and (B) respectively. Rhamnolipid and PHA productions are presented for *btaR-* mutants for QS-1, QS-2 and QS-3 in (C) and (D) respectively. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using a one-way ANOVA with post hoc. Dunnett's multiple comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

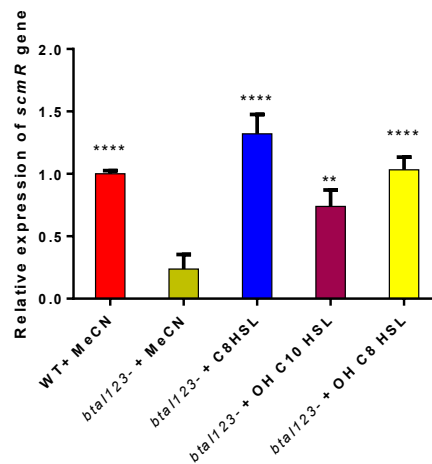
7.4.3 QS modulates the expression of *scmR*.

The regulation of QS or other regulators on rhamnolipid production has never been thoroughly studied in *B. thailandensis*. In another study, we demonstrated that LysR-type regulator ScmR plays a role in both rhamnolipid and PHA biosynthesis (**Section 2**). QS impacted the transcription of the *scmR* gene in LB medium in cultures of *B. thailandensis* (Le Guillouzer, 2018). It was also reported that concentrations of all three AHLs were reduced in a *scmR*- mutant compared to the WT (Mao *et al.*, 2017) when *B. thailandensis* was cultured in LB medium. LB medium was already tested as a rhamnolipid production medium but was not efficient (unpublished datas). We thus investigated the link between ScmR and QS to verify if they were co-dependent in our conditions, allowing the rhamnolipid biosynthesis.

To further investigate the regulation of the *scmR* gene by the QS, the transcription levels of the *scmR* gene were quantified by qRT-PCR in the *B. thailandensis* E264 wild type strain and in the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant in NB with 2% glycerol medium. Since *B. thailandensis* possesses three QS systems (QS-1, QS-2 and QS-3) mainly associated with the production of C8-HSL, 3OHC8-HSL and 3OHC10-HSL respectively, we supplemented or not the AHL-defective $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant with exogenous AHL during the logarithmic growth phase to help identify which of the three QS systems modulates the transcription of *scmR*. We observed that expression of *scmR* was reduced in the absence of AHLs (**Figure 7.3A**), confirming that *scmR* transcription is positively modulated by QS. Furthermore, the transcription of *scmR* was increased in cultures of the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant when C8-HSL, 3OHC10-HSL, or 3OHC8-HSL were added (**Figure 7.3A**), particularly by adding C8-HSL and 3OHC8-HSL, the main products of Bta1 and Bta3.

The transcription of *scmR* in the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants and the *B. thailandensis* E264 wild-type strain was also studied during the logarithmic growth phase in NB with 2% glycerol medium. No difference in the *scmR* transcription was observed when the BtaR2 transcriptional regulator was defective. In contrast, the expression of *scmR* was decreased in both the $\Delta btaR1$ and $\Delta btaR3$ mutants compared to the wild-type strain E264 (**Figure 7.3B**). These observations suggest that both QS-1 and QS-3 stimulate the transcription of *scmR*. However, the QS-2 system is not apparently involved in the modulation of *scmR*.

(A)



(B)

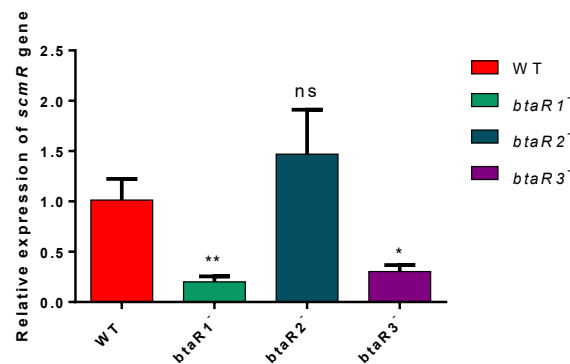


Figure 7.3: QS activates the transcription of *scmR*.

(A) The relative transcript levels of *scmR* from the *B. thailandensis* E264 wild-type and the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant strains were estimated by qRT-PCR. Cultures were supplemented with 2 μ M of C8-HSL, 3OHC10-HSL, or 3OHC8-HSL. Acetonitrile (MeCN) only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The relative transcript levels of *scmR* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent standard deviation from the mean ($n = 3$ independent cultures), Data analysed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons tests (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = not significant).

7.5 Discussion and conclusion

The first part of this study revealed that the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ - mutant leads to a higher production of rhamnolipid and a decrease in PHA biosynthesis.

The first study suggesting a putative relationship between the QS and the rhamnolipid production was a global analysis of the QS effects in *B. thailandensis* which demonstrated that QS affected the transcription of the *rhIA1*, *rhIB1* and *rhIB2* genes encoding the rhamnolipid biosynthesis (C Majerczyk *et al.*, 2014a). However, this study was realized in LB medium which does not favor the production of rhamnolipid in *B. thailandensis* compared to the NB medium with glycerol we used here ((Dubeau *et al.*, 2009) and unpublished data). Plus, no involvement of the QS into the regulation of known PHA synthesis genes was described in this transcriptomic study.

More recently the production of both rhamnolipids and PHAs was specifically studied with the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ - QS defective mutant (Irorere U *et al.*, 2019) and they were both affected. Indeed, rhamnolipid production was increased while PHA biosynthesis was decreased (Irorere U *et al.*, 2019). Our results converge towards these observations. Interestingly, in *B. thailandensis*, QS appears to have an opposite effect on rhamnolipid production vs *P. aeruginosa* or *B. glumae*. Indeed, in *P. aeruginosa*, the disruption of the *rhIR* QS system leads to a deficiency in rhamnolipid production and a functional RhIR is necessary for rhamnolipid biosynthesis (Nakata *et al.*, 1998, Ochsner *et al.*, 1994). Similarly, mutation in the TofI/R quorum sensing system in *B. glumae* downregulates the production of rhamnolipids (Nickzad *et al.*, 2015).

We decided to further investigate the specific role of each individual QS system into the production of rhamnolipids and PHA. Indeed, *B. thailandensis* harbors three QS systems and we hypothesized that they were differently involved. We identified the QS-3 system as responsible for a negative regulation on rhamnolipid production. We also found that QS-3 is an activator of the PHA production in *B. thailandensis*.

We previously suggested that an overproduction of rhamnolipids in *B. thailandensis* could be due to the depolymerisation of PHA granules (**Section 6**). Although the transcriptomic study reported by (C Majerczyk *et al.*, 2014a) did not indicate that the *phaZ* gene could be regulated by QS, this hypothesis should not be excluded since the growth conditions were different than ours. In order to verify this, the levels of transcriptions for the *phaC* and *phaZ* genes could be measured for the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ - mutant and the wild-type strains. These two genes encode for the PHA synthase and the PHA depolymerase, respectively. This could allow to verify if the enhanced rhamnolipid biosynthesis and the decrease of the PHA production are the result of the degradation of the PHA in *B. thailandensis*.

The ScmR regulator is involved in both rhamnolipid and PHA production (**Section 4**). Indeed, a *scmR*- mutant also presented an increased production of rhamnolipid and a decreased production of PHAs. The transcription of the *scmR* gene was reported to be regulated by QS (Le

Guillouzer, 2018, C Majerczyk *et al.*, 2014a). Also, the production of all three AHLs is reduced in a *scmR*- mutant (Mao, 2017) which mimics the QS-deficient mutant. It is thus possible that the higher production of rhamnolipids detected in *scmR*- could be explained by QS-mediated modulation of *scmR* expression.

The presence of a Lux-box into the *scmR* promoter suggests that QS could directly activate the transcription of ScmR (Mao *et al.*, 2017). We verified if the overproduction of rhamnolipids and the decrease in PHAs production by QS could be due to an effect on ScmR. Accordingly, we found lower transcription of *scmR* in both $\Delta btaR1$ and $\Delta btaR3$ mutants. Plus, the addition of the three AHL led to an enhancement of the *scmR* transcription in a $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ mutant during the logarithmic phase, especially by C₈-HSL and the 3OHC₈-HSL, corresponding to the molecules principally produced by the QS-1 and QS-3 systems, respectively. These observations converged towards the results obtained in a non-published study in our lab (Le Guillouzer, 2018), in which the same experiments were performed in cultures of *B. thailandensis* in LB medium. In order to evaluate if the *scmR* would be only activated by the QS systems, the *btaR1-sc mR*- , *btaR2-sc mR*- and *btaR3-sc mR*- mutants could be studied.

Interestingly, a recent study reported an interdependence between the QS1 and QS3 systems (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Indeed, *bta3* transcription is controlled by the BtaR1/C₈-HSL complex during the logarithmic growth phase while BtaR3 could be involved in the modulation of the *bta1* gene in conjunction with 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL (Le Guillouzer *et al.*, 2017). In our experiments, we observed a significant enhancement in rhamnolipid production and a decrease in PHA accumulation in the *bta3*- and *btaR3*- mutants, consistent with a *scmR* activation by the QS-3 system. However, a *bta1*- mutant harbors the same phenotype as the wild type strain. In contrast, a *btaR1*- mutant produces a little less PHAs than the wild type while the rhamnolipid production is similar in the two strains. In addition, we showed that the *scmR* transcription is activated by BtaR1, maybe related to the indirect activation of the QS-3 system by the QS-1 system.

Rhamnolipid production was higher in the *scmR*- mutant compared to the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ - mutant. Indeed, the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ strain produced 1.7 times more rhamnolipid compared to the wild-type strain while the *scmR*- mutant produced about 3 times more rhamnolipid than the wild-type. Similarly, the PHA production was reduced by 40% in the $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ and 50% in the *scmR*- mutant. Collectively, these observations suggested that the QS is not the only activator of the *scmR* gene and so other regulator are involved into the

scmR modulation. We could test a strain with mutations in both *scmR* and in QS system genes for rhamnolipid and PHA production.

In conclusion, the main aim of this study was to further characterize the involvement of the QS in the production of both rhamnolipid and PHA in *B. thailandensis*. We demonstrated that the QS-3 system principally contributed for the phenotype observed in the $\Delta bta11\Delta bta12\Delta bta13$ -mutant. We also verified the QS-dependent regulation of the *scmR* gene. Judging by the difference in PHA and rhamnolipid production we observed between the $\Delta bta11\Delta bta12\Delta bta13$ and *scmR*-mutants, we concluded that *scmR* was not modulated by QS only, suggesting a new strategy for the optimization of the rhamnolipid production.

7.6 Funding informations

This work was supported by Discovery grant No. RGPIN-2015-03931 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SM was recipient of a Ph.D. scholarship awarded by the Fondation Armand-Frappier..ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

7.7 Acknowledgements

Thanks to Marie-Christine Groleau for insightful comments, technical advises and for reviewing the article.

7.8 Résultats additionnels de l'article

7.8.1 Production de rhamnolipides dans les mutants cumulatifs du QS et de *scmR*.

Une étude avait déjà été réalisée au sein du laboratoire mais n'avait pas été publiée, dans laquelle des mutants combinés avaient été étudiés : la mutation dans le gène *scmR* ayant été associée à des mutations dans chacun des 3 systèmes de QS (Humery, 2013). Ainsi dans cette étude, la production des rhamnolipides avait été caractérisée chez les mutants *scmR-bta11*-, *scmR-bta12*-, *scmR-bta13*- et *scmR-bta11-bta12-bta13*-. Ces mutants étaient disponibles dans la banque de souches du laboratoire Déziel, et ont été obtenus par transfert chromosomique par transformation naturelle (Humery, 2013). Cependant, il faut bien noter que ces résultats ont été obtenus alors que la production des PHAs par *B. thailandensis* n'avait pas encore été mise en évidence (Funston *et al.*, 2017). En conséquence, l'observation de la production de rhamnolipides

en fonction de la DO_{600} n'est pas pertinente, puisque nous avons démontré que la production de PHA interfère avec les mesures de densité optique (**Section 2**). Les cinétiques de production, présentées dans la **Figure 7.4**, devront donc être refaites dans la mesure où il faudra intégrer les dénombrements cellulaires associés à chaque souche étudiée. En effet, le défaut de croissance apparent dans les données de DO_{600} n'est probablement pas réel, comme présenté dans la **Section 4** décrivant le travail mené sur le mutant *scmR*⁻ et dans lequel la différence de DO_{600} est en fait liée à une diminution de la production de PHA. De ce fait, quand les expériences seront refaites, il sera aussi judicieux de quantifier les PHAs dans les différentes souches. Malgré tout, la production des rhamnolipides peut tout de même être considérée pour tirer des conclusions quant à l'effet cumulatif des mutations du QS associées à la mutation dans *scmR*. Dans chaque graphique présenté la cinétique de production est présentée pour la souche sauvage (en rouge), pour le mutant *scmR*⁻ (alors nommé *hmqR*⁻) (en violet), puis le mutant *btaI* du système de QS étudié ainsi que le mutant combiné *btaI*-*scmR*⁻. Ainsi l'étude du mutant *btaI1*⁻ seul ou associé avec *scmR*⁻ est représenté en vert, celle du mutant *btaI2*⁻ seul ou associé avec *scmR*⁻ en bleu, celle du mutant *btaI3*⁻ seul ou associé avec *scmR*⁻ en orange et enfin celle du triple mutant *btaI1btaI2btaI3* en gris. Le mutant *scmR*⁻ produit plus de rhamnolipides que la souche sauvage. Le but ici est de confirmer si ScmR agit de façon dépendante ou non avec le QS pour la production de rhamnolipides.

Par exemple, dans la première figure (en haut à gauche), on note que la mutation simple dans le gène *btaI1* présente une production très similaire à celle de la souche sauvage, alors que le mutant combiné *btaI1*-*scmR*⁻ conduit à une surproduction des rhamnolipides. Cependant, cette augmentation de la production de rhamnolipide reste inférieure à celle du mutant *scmR*⁻ seul. De façon intéressante la valeur de DO associée au double mutant *btaI1*-*scmR*⁻ est encore plus basse que celle observée pour le mutant simple *scmR*⁻, ce qui pourrait suggérer, en accord avec la **Figure 7.2** et avec les observations réalisées en **Section 2**, que la production de PHA est moindre. De ce fait, on aurait pu s'attendre à une production plus importante de rhamnolipides si ceux-ci sont en partie produits à partir de la dépolymérisation des PHAs, comme démontré en **Section 6**. Cependant ce mécanisme de régulation des PHAs par la dépolymérisation pourrait avoir lieu dans des conditions spécifiques de production trop importante de PHA. Il est possible que dans le cas observé ici, la production basale de PHA dans le mutant *btaI1*-*scmR*⁻ soit moindre et que la dépolymérisation ne soit pas impliquée. Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression du gène *phaZ*, codant la PHA-dépolymérase, dans les différents mutants *scmR*⁻, *btaI1*⁻ et *btaI1*-*scmR*⁻ afin de vérifier si la dépolymérisation est activée et joue un rôle dans la surproduction de rhamnolipides observée chez les mutants *btaI*-*scmR*⁻ et *scmR*⁻.

Le profil de production associé aux mutants *btaI2-* et *btaI2-scmR-* est présenté en haut à droite de la figure. Là encore le mutant seul *btaI2-* a une production de rhamnolipides assez similaire à celle de la souche sauvage, alors que la production de rhamnolipides du mutant combiné *btaI2-scmR-* est similaire à celle du mutant *scmR-* seul. Ceci confirme les conclusions obtenues à la **Section 7.4.2**, puisque la **Figure 7.2** indique que le QS 2 ne serait pas impliqué dans la production des PHA ou des rhamnolipides. De plus, la **Figure 7.3**, présentée en **Section 7.4.3**, indique que le système de QS2 ne serait pas non plus impliqué dans la régulation de l'expression de *scmR*.

Le mutant *btaI3* (**Fig 7.4**, en bas à gauche), produit plus de rhamnolipides que la souche sauvage. On observe également une légère baisse de la DO_{600} , qui pourrait traduire la baisse de PHAs décrite dans la **Figure 7.2**. Le double mutant *btaI3-scmR-* produit plus de rhamnolipides que la souche sauvage et que le mutant *scmR-*, suggérant qu'en plus du rôle de *btaI3* dans l'activation *scmR* démontrée à la **Figure 7.3**, *BtaI3* serait impliqué dans d'autres mécanismes favorisant la production de rhamnolipides. L'effet cumulatif de ces deux mutations permet d'obtenir une souche produisant 10 fois plus que la souche sauvage. La souche ainsi obtenue représente donc un excellent candidat pour une production à plus grande échelle, si tant est que l'utilisation d'un micro-organisme génétiquement modifié ne soit pas un problème.

Le triple mutant *btaI1btaI2btaI3-* produit plus de rhamnolipides que la souche sauvage (**Figure 7.4**, en bas à droite), tel que démontré dans la littérature (Irorere U *et al.*, 2019) et dans la **Figure 7.1**. J'ai aussi démontré que la production de PHAs est diminuée dans ce mutant, ce qui se traduit par une baisse de la valeur de densité optique observé dans les **Figures 7.1** et **7.4**. Le mutant combiné *btaI1btaI2btaI3-scmR-* produit la même quantité de rhamnolipides que le mutant *scmR-*, soit environ 6 fois plus que la souche sauvage (**Figure 7.4**). On note également que les valeurs de DO_{600} sont plus basses pour le mutant combiné que pour le mutant *scmR-* seul, suggérant que la production de PHA pourrait être encore amoindrie.

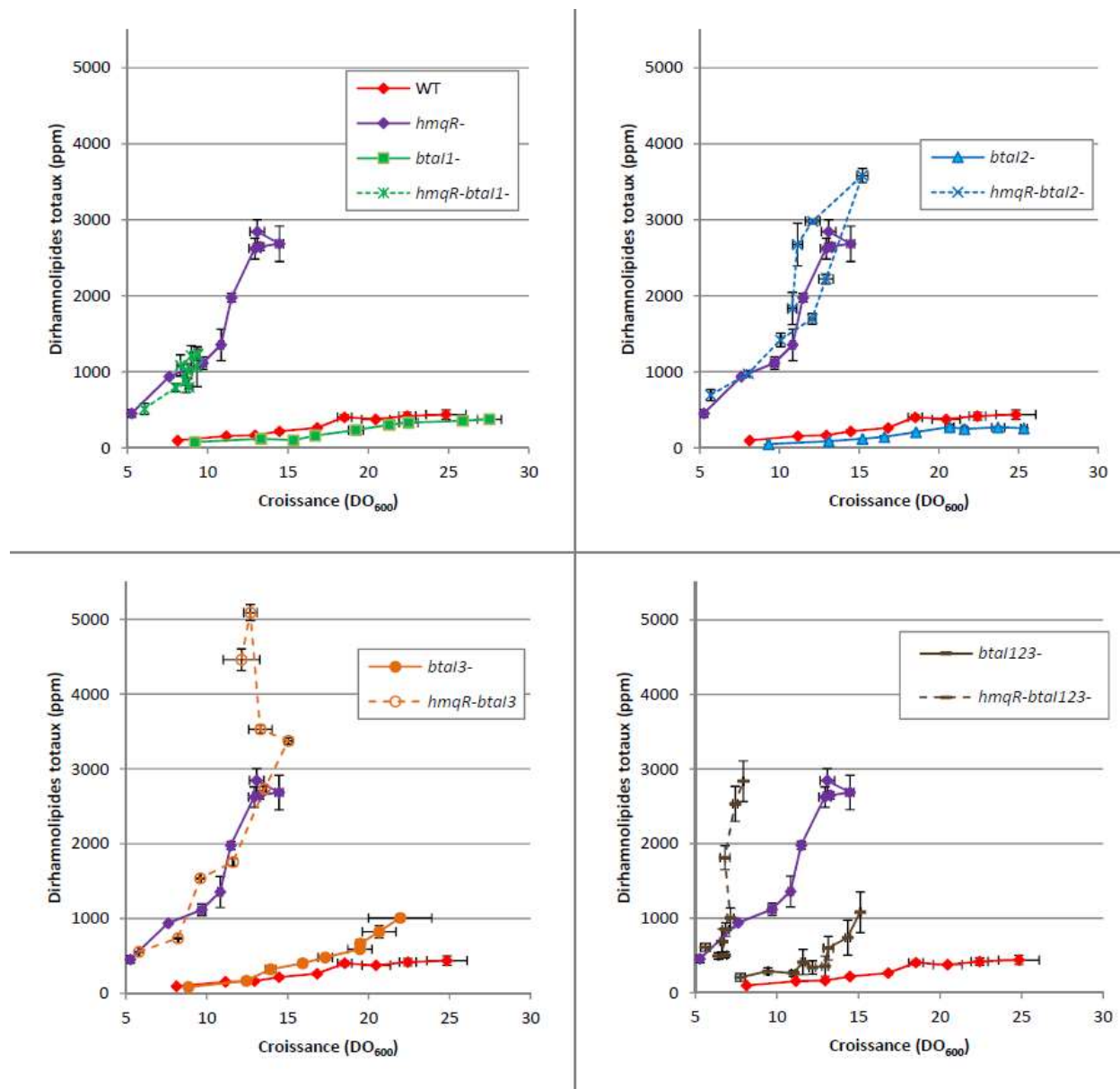


Figure 7.4 : Cinétiques de production de rhamnolipides dans les mutants combinés des systèmes de QS et *scmR* (alors appelé *hmqR*) par rapport à la DO_{600} .

Figure tirée de (Humery, 2013). Les cultures ont été réalisées en milieu NB+4% glycérol pendant 9 jours. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne (n=3 réplicats)

7.8.2 Conclusions générales de l'article

A partir des résultats obtenus, il a pu être conclu que le QS2 ne semble pas être impliqué dans la production des rhamnolipides ni dans celle des PHAs, bien que l'ajout de OHC₁₀-HSL,

produite par BtaI2, dans les cultures du triple mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ permette de restaurer le niveau de transcription de *scmR* au niveau de celui de la souche sauvage.

En revanche il apparait clairement que le QS3 joue un rôle aussi bien dans l'activation de *scmR* mais également sur la production des rhamnolipides et des PHAs, puisque le double mutant *btaI3-scmR*- produit plus de rhamnolipides et semble produire moins de PHAs que les mutants simples *scmR*- et *btaI3*-. Ainsi le QS3 serait impliqué dans d'autres mécanismes reliés à la biosynthèse des rhamnolipides et des PHAs. Il serait un répresseur de la production des rhamnolipides et au contraire activerait la production des PHAs.

Le rôle du QS 1 reste plus flou. En effet, l'ajout de C₈-HSL dans des cultures du triple mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ permet de restaurer le niveau de transcription de *scmR* par rapport à la souche sauvage. De plus il apparait que l'inactivation du gène *btaR1* se traduit par une diminution de la transcription de *scmR*, suggérant que le QS1 agirait comme un activateur de *scmR*. Cependant, l'étude d'un simple mutant *btaI1*- n'a pourtant pas mené à une surproduction de rhamnolipides, pourtant caractéristique du phénotype du mutant *scmR*-. Cette observation pourrait indiquer que le QS1 ne régulerait pas directement *scmR* et qu'il ne serait pas impliqué dans d'autres mécanismes le reliant à la synthèse des rhamnolipides. De façon intéressante, il a été récemment prouvé que le QS1 et le QS3 sont étroitement liés puisque le QS1 activerait le QS3 (Le Guillouzer *et al.*, 2017). En ce sens, on peut avancer l'hypothèse que le QS1 agirait comme un activateur du QS3, qui lui-même activerait l'expression de *scmR* et inhiberait la production des rhamnolipides. Ainsi dans le double mutant *btaI1-scmR*-, l'inactivation de *btaI1* réduirait la transcription de *btaI3* et par conséquent contribuerait indirectement à l'augmentation de la production des rhamnolipides sous le contrôle du QS3.

Toutes ces observations sont regroupées dans la **Figure 7.5**, dans laquelle sont représentées les interactions entre les différents systèmes de QS, ScmR, et les systèmes responsables de la production des PHAs et des rhamnolipides. Il sera intéressant de vérifier les niveaux d'expression de *phaC* et *phaZ* dans les différents mutants *scmR*-, *btaI3*-, *btaI3-scmR*- ou encore *btaI1*- et *btaI1-scmR*- afin de vérifier si la baisse de production de PHA observées est reliée à une diminution de la transcription de la PHA synthase ou au contraire à une augmentation de la transcription de la PHA dépolymérase.

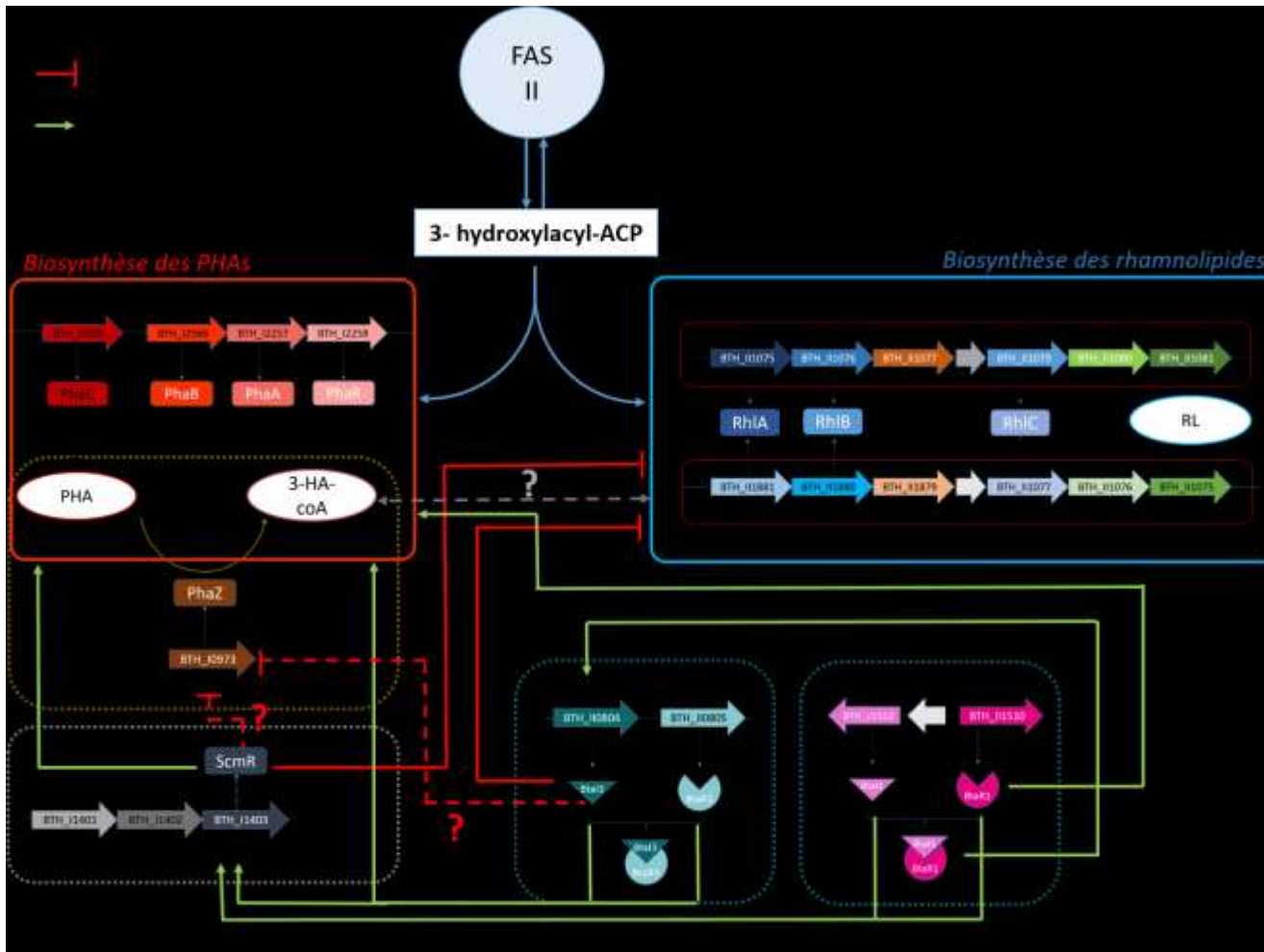


Figure 7.5 : Bilan des interactions entre le QS1, QS3, ScmR et les systèmes de production de PHAs et de rhamnolipides.

Les cadres pleins correspondent aux voies métaboliques codant respectivement pour la biosynthèse, en rouge, des PHAs et, en bleu, des rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Chaque cadre en pointillés correspond à un mécanisme de régulation mis en évidence ici. Les flèches vertes et rouges indiquent une activation ou au contraire une inhibition des systèmes, respectivement. Les points d'interrogations sur les flèches en pointillés indiquent que des expériences restent à faire pour valider l'hypothèse avancée

8 PRESENTATION DE L'ARTICLE 6

Implementation of Taguchi's table for the optimization of rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis*

Utilisation de la méthode de Taguchi pour l'optimisation de la production de rhamnolipides chez *Burkholderia thailandensis*

Auteurs :

Sarah Martinez et Eric Déziel

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), 531 Boul. des Prairies, Laval, Qc H7V 1B7

*Corresponding author: eric.deziel@iaf.inrs.ca

Tel: 450 687-5010

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Non soumis

Contribution des auteurs :

SM : planification du design expérimental, réalisation des expérimentations, rédaction du manuscrit

ED : planification du design expérimental, rédaction du manuscrit.

Nous avons identifié des souches avec un potentiel de production de rhamnolipides augmenté : les mutants *scmR*-, *qsmR*-, *btal/R3*- ou *phaR*-, correspondant aux améliorations métaboliques de la souche sauvage E264. Indépendamment de l'optimisation de la capacité bactérienne à produire la molécule d'intérêt, le milieu de culture joue aussi un rôle important. En effet, la production des rhamnolipides est favorisée par des facteurs nutritionnels tels que la limitation en certains ions ou encore la présence de certaines sources d'azote comme les nitrates. Cette partie du projet vise donc à définir un milieu de culture permettant la surproduction des rhamnolipides. De plus, un des défis liés à la mise en place de bioprocédés à l'échelle industrielle est l'utilisation de milieu minimal et défini, préféré *Animal-Free*. Nous avons donc mis en place un plan d'expérience afin de tenter de répondre à ces exigences.

8.1 Abstract

Burkholderia thailandensis is a biosafety level 1 bacterium capable of producing rhamnolipid biosurfactants, which have been extensively studied since their first discovery in *Pseudomonas aeruginosa*. More recently the *Burkholderia* genus has been reported as a producer too, and several species are able to synthesize rhamnolipid. For instance, *B. thailandensis* present an advantage because this species produces one main congener of rhamnolipid, facilitating the purification processes. However, *Burkholderia* rhamnolipids are not commercially available yet, due to low yields. In this context, to further investigate the factors affecting rhamnolipid production, we implemented a Taguchi's method. First of all, carbon sources, temperature, nitrogen and phosphate sources were screened, and then we evaluated the effect of seven inorganic nutrients and one physicochemical parameters on rhamnolipids production. Finally, we performed a validation run, leading to an increase of 3 times in rhamnolipid production compared to the initial non optimized conditions.

8.2 Introduction

Rhamnolipids belong to the glycolipids family biosurfactants, and they have been extensively studied since *Pseudomonas aeruginosa* was described for the first time as a producer (Jarvis *et al.*, 1949). Indeed, rhamnolipids are bacterial secondary metabolites representing an increased interest as replacements for synthetic ones (Markus Michael Müller *et al.*, 2012). Indeed, they are biosurfactants whose main properties are a better biodegradability, a lower toxicity and a stable activity under extreme conditions of pH, temperature or salinity compared to

their synthetic counterparts (Banat *et al.*, 2010, Desai *et al.*, 1997b). In addition, they represent interesting alternatives to their synthetic counterparts since their production and purification are more environmentally friendly. However, the biotechnological processes generate low yields. Current bioprocesses used *P. aeruginosa* which is a human opportunistic pathogen (Lyczak *et al.*, 2000), requiring high biosafety measures and so increasing the production costs. Because of that, the value of the end-product is decreased, especially as the cost related to the purification processes and the raw material are important.

Rhamnolipid production was more recently described in the *Burkholderia* genus, more specifically in *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009), *B. glumae* (Costa *et al.*, 2011), *B. kururiensis* (Tavares *et al.*, 2013), and *B. plantarii* (Hörmann *et al.*, 2010). *B. glumae* and *B. thailandensis* present the best potential for rhamnolipid production at large scale with previously published yield values of 1000.7 mg/L and 1473 mg/L respectively (Costa *et al.*, 2011, Dubeau *et al.*, 2009). *B. glumae* produces a mixture of different congeners whereas *B. thailandensis* synthesizes one main congener of rhamnolipid (Dubeau *et al.*, 2009). Based on these observations, *B. thailandensis* was chosen to perform the optimization work, because purification steps could be easier, and thus lead to a cost-effective industrial process.

Factors playing a role into the biosynthesis of rhamnolipids in the *Burkholderia* genus are poorly known. However, in *P. aeruginosa*, some physico-chemical and nutritional elements have already been described as involved into the biosynthesis of rhamnolipids. For instance, the pH, the aeration, the temperature of the culture influence the rhamnolipid, as does the nature of carbon, nitrogen or phosphorous sources (Vanavil *et al.*, 2014).

Three steps are necessary for the implementation of Taguchi methods. Designing the experiment represents the first step, then the experiments are performed and analyzed, and finally a validation assay is accomplished to confirm the predictive model (Morsi *et al.*, 2004). Taguchi methods are based on the use of orthogonal array, which allows the distribution of the variables, also named factors, in a balanced manner (Alexis, 1995).

Our work here comprises a first step of optimization, aiming at the identification of a minimal medium which allows the production of rhamnolipids. Then we screened different carbon, nitrogen and phosphorous sources and minimal medium composition in order to select the best candidates for the production medium. Subsequently, we defined the best temperature for cultivation and rhamnolipid production. Finally, we implemented a Taguchi method to identify the best conditions for the optimization of rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis*.

8.3 Materials and methods

8.3.1 Microorganism and inoculum preparation

B. thailandensis E264 was routinely regrown from frozen stocks by culturing at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) and 150 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada). For inoculation, an overnight culture was centrifuged and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in PBS which was then used to inoculate cultures by adjusting the optical density at 600 nm (OD_{600}) to 0.05. Unless otherwise specified, all experimental design cultures were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of the appropriate medium for 6 days in rotary incubator shakers (Infors). When indicated, HEPES (pH=7) at 200mM was added in the medium.

8.3.2 Quantification of rhamnolipid

Rhamnolipid were quantified as previously described (**Section 4.4.7**).

8.3.3 Selection of minimal medium

No minimal medium is currently documented for rhamnolipid production in *B. thailandensis*. Three minimal salt media were tested here based on mineral media described in different studies for rhamnolipid biosynthesis by other bacteria, as *Pseudomonas aeruginosa* or *Burkholderia glumae*, with some adjustments. M9 medium contained (g/L): 15 KH_2PO_4 , 64 Na_2HPO_4 , 0.1 $CaCl_2$, 2.0 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 $NaCl$ and 13.78 $NaNO_3$ (Smith *et al.*, 2016). BGR1 medium was composed as follows (g/L): 3.67 KH_2PO_4 , 2.643 K_2HPO_4 , 0.13 $CaCl_2$, 0.1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 9 urea (Nickzad *et al.*, 2018). Finally, the PA14 medium contained (g/L): 0.9 Na_2HPO_4 , 0.7 KH_2PO_4 , 2.0 $NaNO_3$, 0.1 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and trace element solution (2 mL/L) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). The composition of trace elements solution was (g/L): 2.0 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 0.6 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. Experiments were realized in micro-plates: 200 μ L of medium were inoculated at starting OD_{600} 0.2 and the plates were incubated in a Bioscreen (Growth Curves, USA) during 72h at 37°C.

8.3.4 Selection of optimal carbon source

Based on literature, economic considerations and BIOLOG datas (see **Section 11: Annexe 1**), we chose to study several carbon sources: glycerol, sucrose, dextrose, mannitol,

sorbitol, ethanol, canola oil, fructose, corn oil, sodium gluconate, sodium pyruvate, sodium succinate, sodium octanoate, sodium fumarate, sodium benzoate, sodium acetate and sodium formate. The carbon sources were added in the medium at a concentration fixed at 1.6M, except for the corn oil. Medium was supplemented with 4% (w/v) with corn oil. A lower concentration of ethanol (0.8M) was also tested, due to the toxicity of this compound for *B. thailandensis*.

These feedstocks were first screened by evaluating the growth of *B. thailandensis* in microplates: 200 μ L of medium were inoculated at starting $OD_{600} = 0.2$ and the plates were incubated in Bioscreen during 72h at 37°C. Based on these results we select 9 carbon sources allowing the best growth, we realized a new screening considering both growth and rhamnolipid production. Cultivation was performed for 6 days in 5 mL of the culture medium in test tubes incubated at 37°C and shaking in TC-7 roller drum at 240 rpm. HEPED was added for this assay. The experiment was repeated two times, and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the significance of each carbon or nitrogen source on the rhamnolipid production for the statistical confidence of 95%.

8.3.5 Ethanol toxicity evaluation

Since ethanol represent a toxic element for bacteria at high concentration, we evaluated the maximal ethanol concentration, as indicated by the inhibition of growth. Cultures with 2%, 4%, 6% and 8% (v/v) ethanol were performed in five replicates in microplates: 200 μ L of non-optimized PA14 medium were inoculated at starting $OD_{600} = 0.2$ and the plates were incubated in the Bioscreen during 110h at 37°C.

8.3.6 Ethanol consumption measurement

Samples were centrifugated at 8,000 x g and the supernatant was collected: 50 μ L of supernatant were diluted in 400 μ L of water and 50 μ L of internal standard (1,4 cyclohexanedione, 70 mg in 25 mL water) were added. Quantification of ethanol was performed on a gas chromatograph model 5890A (Hewlett-Packard, Arondale, PA, USA) coupled to a flame ionisation detector (GC-FID) and equipped with a 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m Zebron ZB-Wax capillary column (Phenomenex). The oven temperature program was as as follow: initial temperature 35 °C held for 4 min, then ramped at 50 °C/min to 220 °C and held for 3 min. The temperature of the split-splitless injector was 150 °C and the temperature of the detector was 260 C.

8.3.7 Selection of optimal temperature

We evaluated a whole range of temperatures: 25, 30, 32, 34, 37 and 40°C. We chose the extremes in accordance with industrial priorities and data found in the literature. *B. thailandensis* is a mesophilic soil bacterium (Paul J Brett *et al.*, 1998). That is why we proposed these values of temperature. Experiments were performed in 4 replicates in 125 mL-baffled flasks containing 25 mL of MSM medium with 2% ethanol during 6 days under a 200 rpm rotary agitation (Infors). Rhamnolipid were quantified in one final point. The experiment was repeated two times, and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the significance of each carbon or nitrogen source on the rhamnolipid production for the statistical confidence of 95%.

8.3.8 Selection of optimal nitrogen and phosphates sources

Six nitrogen sources were studied here: urea, NaNO₃, KNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ and peptone. They were added to a minimal medium based on a fixed molarity (calculated from the molarity of NaNO₃ in the minimal medium first tested): 20 mM. Six combinations of three phosphates (KH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄) sources were studied here (**Tab. 8.1**). They were added to a minimal medium based on a fixed molarity (calculated from the molarity of the combination of KH₂PO₄ and Na₂HPO₄ in the minimal medium first tested): 0.1 M. The effects of various nitrogen and phosphorus sources were tested by using ethanol as the carbon source. Experiments were performed in 125 mL-baffled flasks containing 25 mL of MSM medium with 2% glycerol during 6 days under a 200 rpm rotary agitation (Infors). HEPES at pH=7 was added in the medium before inoculation at DO₆₀₀=0.05. Rhamnolipid were quantified in one final point. The experiment was repeated two times, and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the significance of each nitrogen or phosphorus source on the rhamnolipid production for the statistical confidence of 95%.

Tableau 8.1: Phosphates concentration used for the different tested combinations

	Comb 1	Comb 2	Comb 3	Comb 4	Comb 5	Comb 6
KH ₂ PO ₄	0.1M	0.05M	0.05M	/	/	/
K ₂ HPO ₄	/	0.05M	/	0.1M	0.05M	/
Na ₂ HPO ₄	/	/	0.05M	/	0.05M	0.1M

8.3.9 Taguchi's table

Once the medium compounds were chosen, an experimental plan have to be implemented in order to define the best concentration of each nutrient.

A set of fractional factorial designs is used for Taguchi experimental plans, consisting of an orthogonal array, which concentrate on main effect estimation. The design of experiments using the orthogonal array drastically reduces the number of experiments to be performed. In our study, Taguchi tables were used and more specifically a L16 design, which allowed to study until fifteen parameters with 16 runs, including some interactions studies. For each factor, two values can be evaluated. Several configurations are available for L16 Taguchi designs. We chose the following configuration and we attribute the factors as described below. In this model, each number corresponds to an effect. More precisely, a number above or below a line actually represents an interaction between the two factors corresponding to the numbers on both sides of the line. For instance, the factor number 3 gives the response of the interaction between the factors 1 and 2. We tried to wisely distribute the factors we wanted to study in this model in order to minimise the probability of interactions between the factors. Based on this strategy here is the model we set up (**Figure 8.1**).

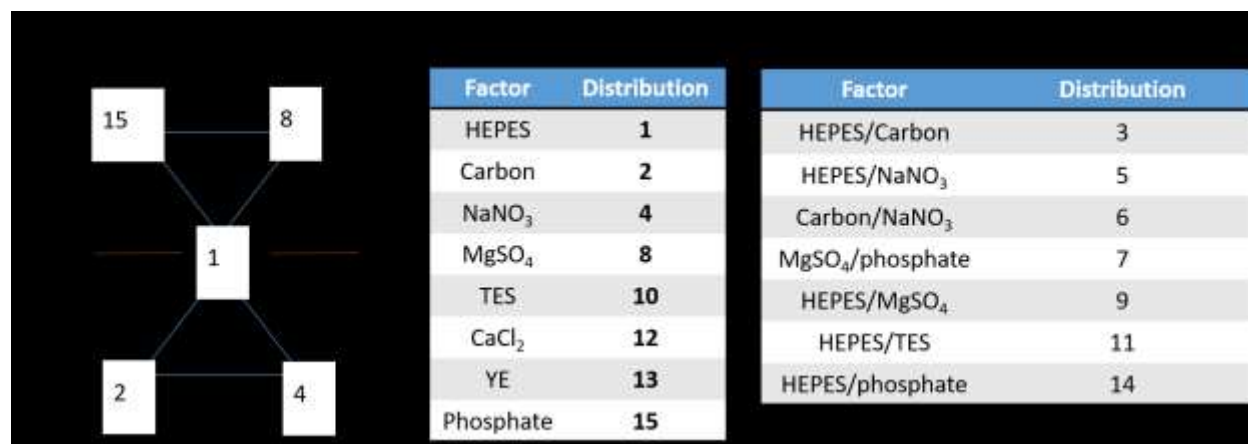


Figure 8.1: Repartition of the factors in the Taguchi's Design L16.

(A) Taguchi's design, (B) Distribution of the factors we studied, (C) Putative interactions.

Sixteen runs were performed as described below, for *B. thailandensis* E264 strain (**Tableau 8.2**). The orthogonal matrix is based on (Alexis, 1995).

Tableau 8.2: Experimental design of the L16 Taguchi table (“-“=absence; “+“=presence)

N assay	HEPES (200mM)	EtOH (M)	NaNO₃ (mM)	MgSo₄ (mM)	TES (2ml/L)	CaCl₂ (mM)	YE (5g/L)	Phosphates (mM)
1	-	0.4	20	1.6	-	0.9	-	25
2	-	0.4	20	3.2	+	1.8	+	50
3	-	0.4	100	1.6	-	1.8	+	50
4	-	0.4	100	3.2	+	0.9	-	25
5	-	0.8	20	1.6	+	0.9	-	50
6	-	0.8	20	3.2	-	1.8	+	25
7	-	0.8	100	1.6	+	1.8	+	25
8	-	0.8	100	3.2	-	0.9	-	50
9	+	0.4	20	1.6	-	0.9	+	50
10	+	0.4	20	3.2	+	1.8	-	25
11	+	0.4	100	1.6	-	1.8	-	25
12	+	0.4	100	3.2	+	0.9	+	50
13	+	0.8	20	1.6	+	0.9	+	25
14	+	0.8	20	3.2	-	1.8	-	50

15	+	0.8	100	1.6	+	1.8	-	50
16	+	0.8	100	3.2	-	0.9	+	25

YE = yeast extract

Level average analysis, as described by Taguchi (Peace, 1993, Taguchi, 1976), is one of the techniques used to explore the results of the Taguchi methods : the average effect of each factor is determined on the outcome of the experiment. Hence the factors that have the strongest effects are identified.

The equation below shows the method of calculating the average effect of the experiment:

$$T = \frac{Y1 + Y2 + \dots + Yn}{n}$$

with Y1 = result of the first experiment, Y2 = result of the second experiment, etc., T represents the overall average of the experiment, and n is the number of the experimental runs.

For example, for the calculation of the effect of the two values of factor A, A1 and A2 represent the average effect of factor A for levels 1 and 2, respectively. The equations below allow the evaluation of the effect for each level.

$$A1 = \frac{Y1 + Y2 + \dots + Y8}{8}$$

$$A2 = \frac{Y9 + Y10 + \dots + Y16}{8}$$

For each factor, the relative impact (ΔX) is calculated as the difference between the highest and the lowest average response of each level (Morsi *et al.*, 2004). By this way the effects of all factors, allowing the identification of the factors with the strongest effect.

8.3.10 Confirmation run.

After we determined the impact of each factor on the rhamnolipid production, we calculated their combined effect since the effects of each factor is cumulative in the Taguchi's methods. By this way a new experiment is designed depending on the the results generated by

the L16 table. This experiment was carried out in order to validate the model based on the assumptions.

8.4 Results and discussion

8.4.1 Selection of a minimal medium

In order to define a minimal medium allowing the growth of *B. thailandensis*, we performed cultures in five replicates with different minimal media complemented with 4% glycerol. Growth curves obtained from the Bioscreen revealed that the PA14 medium is the best candidate for *B. thailandensis* cultivation (**Fig 8.2**).

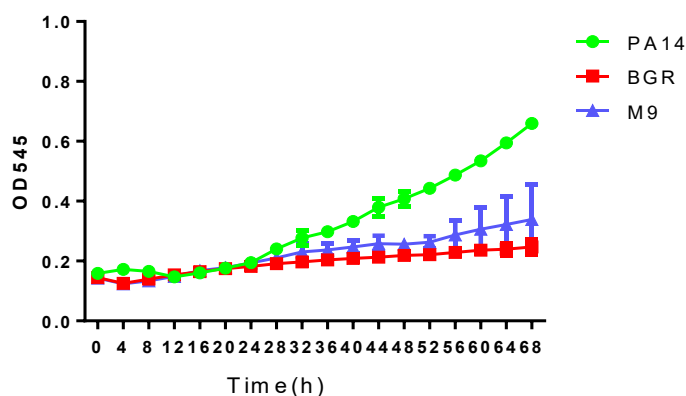


Figure 8.2: Growth evaluation of the E264 strain in different minimal media.

The values are means \pm standard deviations (error bars) for five replicates.

8.4.2 Selection of the optimal carbon source

Biolog data (**Section 11**) allowed us to select several carbon sources on which *B. thailandensis* E264 can grow. Among them, we decided to test sugars, oils, acids, amino acids and alcohols. During a first screening in Bioscreen we selected the feedstocks allowing the growth of *B. thailandensis* after 72h (**Fig 8.3**).

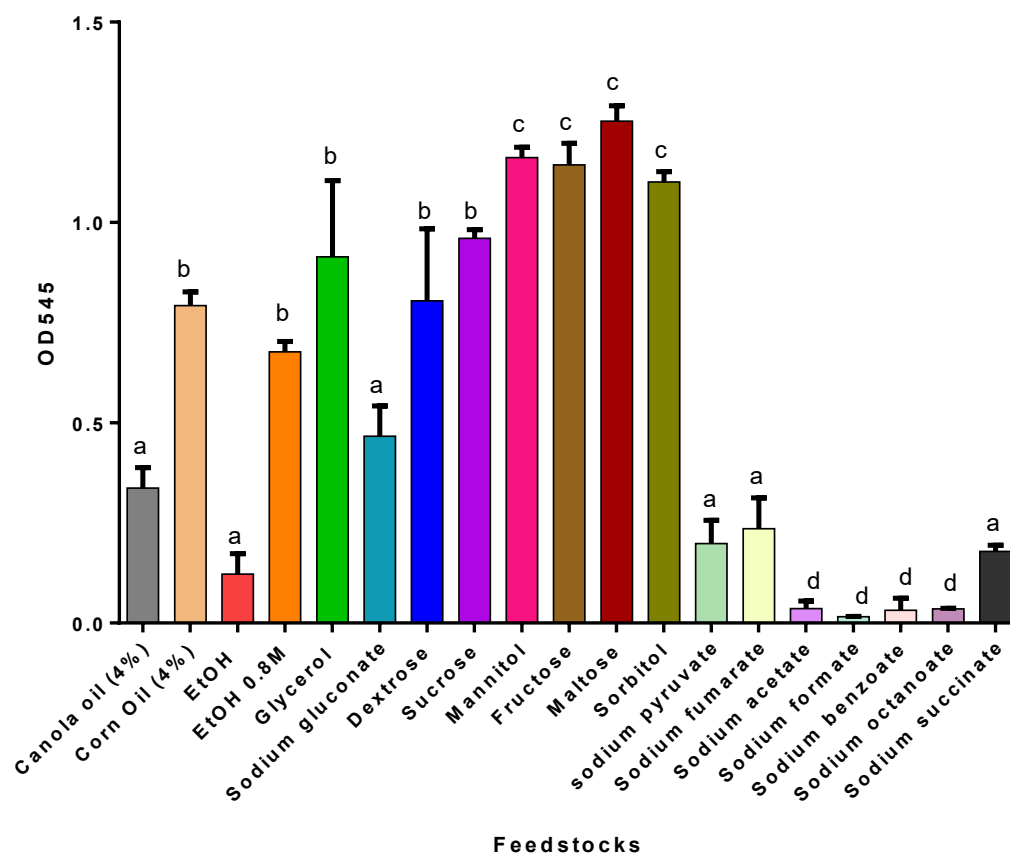


Figure 8.3: Final point of OD₅₄₅ for *B. thailandensis* cultured in different feedstocks

Cultures were performed in the PA14 medium with different carbon sources at 37°C during four days in Bioscreen. Agitation was realized during 20sec before measuring OD₅₄₅ values. Carbon concentration was 1.6M, except for ethanol, for which two different concentrations were tested due to its putative toxicity (1.6M and 0.8M). Corn and canola oil were added at 4% (v/v) in the medium. Statistical difference was determined using an ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$).

This first screening based on biomass formation and the economic considerations allowed us to select 7 feedstocks for the next step, meaning cultures in tubes containing 3 mL of minimal medium during 5 days. The tested feedstocks we selected were: corn oil, glycerol, ethanol (0.8M), sucrose, fructose, mannitol and sorbitol. Cultures of *B. thailandensis* were performed with these different carbon sources at 1.6M, except for ethanol (0.8M) and corn oil (4% v/v). At the end of the cultivation period, the OD₆₀₀ and rhamnolipid production were measured (**Fig 8.4**). The OD₆₀₀ values were better when *B. thailandensis* grew on mannitol or sorbitol (**Fig 8.4A**), however we

demonstrated in previous work that the OD_{600} can be biased by the polyhydroxyalkanoate (PHA) content in cells (**Section 3**). Therefore, we cannot conclude at this point if the differences seen depend solely on the growth of bacteria or if the PHA production has an impact on the OD_{600} values. Moreover, the rhamnolipid production is similar for cultures performed in glycerol, mannitol, sorbitol, corn oil or ethanol. Based on economic considerations, with equal production, the two best feedstocks were decided to be glycerol and ethanol; besides its affordability, the latter could represent an asset for fermentations because it was previously described for its anti-foam property. That is why ethanol was selected for the next steps of optimization.

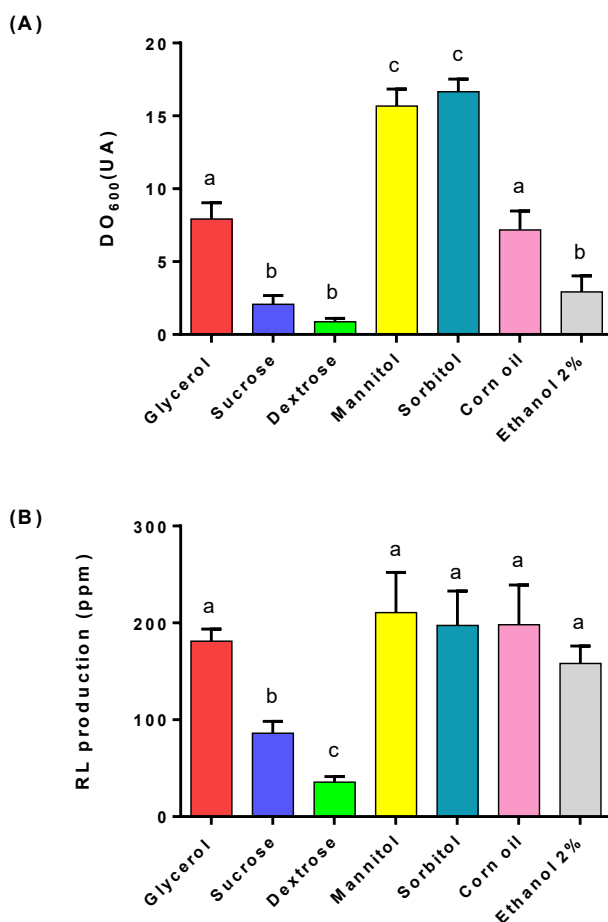


Figure 8.4: OD_{600} and rhamnolipid production in *B. thailandensis* after 5 days of cultivation in minimal medium with different feedstocks at 37°C.

Cultures were performed in PA14 medium with 1.6M of different carbon sources, except for the ethanol addition, which was at 0,8M. Statistical difference was determined using an ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$).

8.4.3 Study of the ethanol toxicity

Since ethanol is appropriate for both growth and rhamnolipid production, we decided to evaluate the toxicity of this carbon source. We performed cultures at different ethanol concentrations to define the growth inhibitive concentration. Cultures were realized using the Bioscreen, with culture volume of 200 μ L. The ethanol concentrations we tested were 2, 4, 6 and 8% (v/v). We only observed growth when *B. thailandensis* was cultured in PA14 medium with 2% ethanol, meaning the higher concentrations were too toxic for the bacteria (**Fig 8.5**).

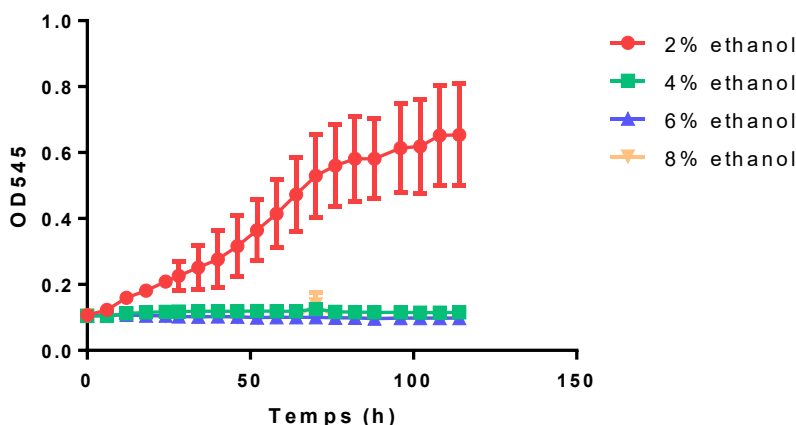


Figure 8.5: Growth evaluation of *B. thailandensis* cultured in minimal medium with 2, 4, 6 or 8% ethanol.

The values are means \pm standard deviations (error bars) for four replicates.

8.4.4 Study of the ethanol consumption

Up to that point, the cultures were performed during 5 days and measures consisted in rhamnolipid and/or biomass evaluation in one final point. In order to evaluate the exact kinetic of the cultures, we performed cultures until total depletion of ethanol. Samples were collected each day and OD₆₀₀ measures (**Fig 8.6A**) and both rhamnolipid and ethanol were quantified (**Fig 8.6B**). The stationary phase was reached after 4 days and was simultaneous with the total depletion of ethanol meaning the ethanol was the limiting factor in our conditions.

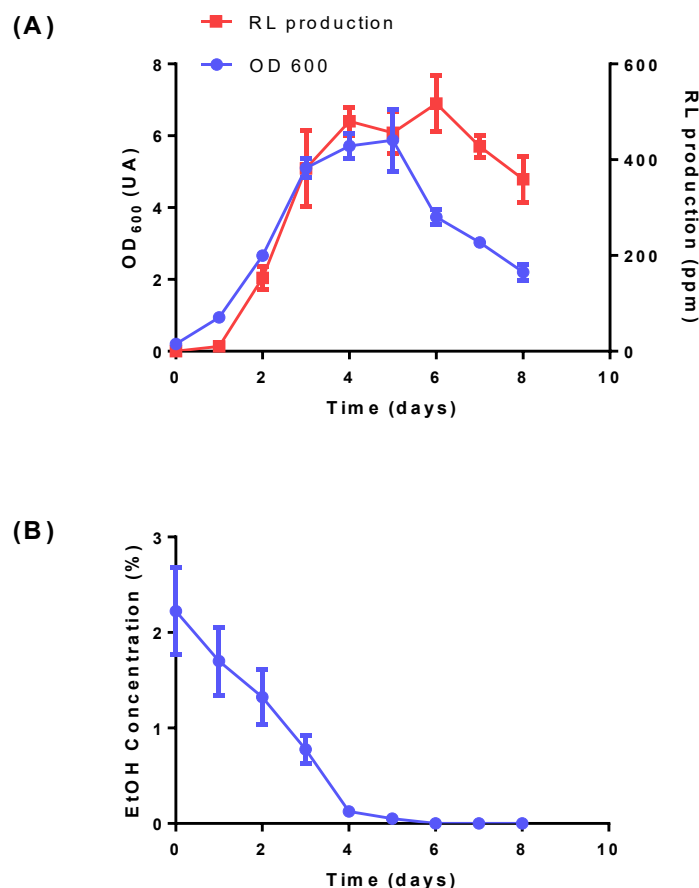


Figure 8.6: Ethanol is the limiting factor when *B. thailandensis* is cultured in minimal medium with 2% ethanol

Culture were performed in PA14 medium with ethanol 2% during 8 days, at 37°C with an agitation at 200 rpm. The values are means \pm standard deviations (error bars) for four replicates.

8.4.5 Selection of the optimal temperature

The results of the preliminary screening for various culture temperatures are shown in **Figure 8.7**. OD₆₀₀ values are presented in the **Figure 8.7A**. Whatever the temperature of growth the OD₆₀₀ reached the same value, around 6. However, the growth rate is different depending on the temperature. Indeed, *B. thailandensis* grew more slowly at 25°C and 40°C, with a stationary phase reached in 6 days compared to the others conditions for which the length of the logarithmic phase was 3 or 4 days.

Among the six temperatures tested, rhamnolipid production was highest when *B. thailandensis* was cultured at 25°C, 30°C, 32°C or 40°C, (**Fig. 8.7B**).

A previous study carried out on *B. thailandensis* demonstrated that the rhamnolipid production is prevented by higher temperatures, which favor PHA production. Indeed, rhamnolipid production reached 2.79 g/L and 1.99 g/L at 25°C and 30°C respectively, when *B. thailandensis* is cultured in shake flasks experiments during 264h in NB medium with 4% glycerol (Funston *et al.*, 2016). In our conditions, we also observed a decrease of the rhamnolipid production when the temperature becomes higher for 35°C and 37°C, with 189 ppm and 136 ppm. The composition of the medium, minimal for our conditions versus rich for Funston *et al.*'s study (Funston *et al.*, 2016), could explain the lag we observe for the range of temperature decreasing the rhamnolipid production. Similarly, a higher temperature (37°C) had a significant negative effect on rhamnolipids production in *B. glumae* compared to cultures performed at 30°C in a minimal medium (Nickzad *et al.*, 2018).

Surprisingly, the rhamnolipid production increased when the cultures were performed at 40°C.

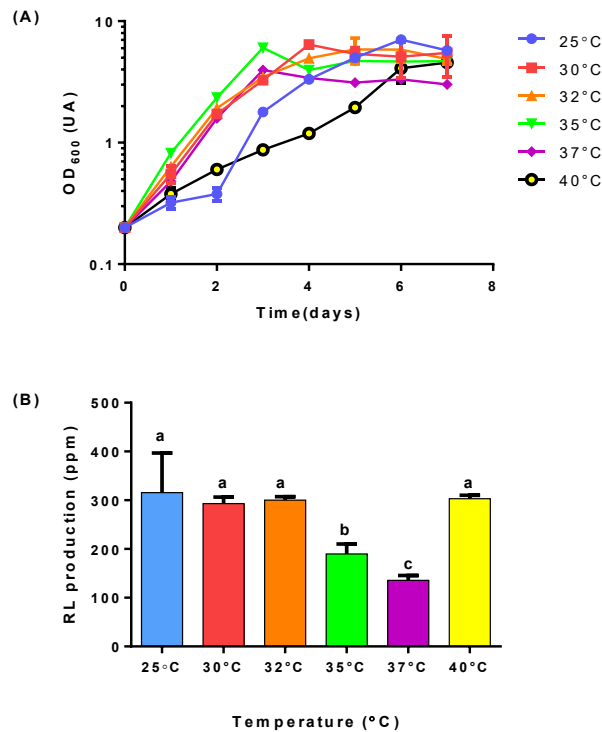


Figure 8.7: OD₆₀₀ measurements (A) and production of rhamnolipids (B) for *B. thailandensis* E264 grown at different temperatures.

Cultures were performed in PA14 medium containing EtOH as carbon source, during seven days, with an agitation at 200 rpm. Different temperatures were tested: 25°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C and 40°C. Statistical difference was

determined using an ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The error bars indicate the standard error of the mean ($n = 4$). The values are means \pm standard deviations (error bars) for four replicates.

Based on the OD_{600} and rhamnolipid values we obtained, we chose to pursue our optimization work with a temperature of 30°C for several reasons. Rhamnolipid production was the best for cultures performed at 25°C , 30°C , 32°C or 40°C , but growth was slower for the extreme temperatures. So in order to develop the shortest and cheapest process, we selected a temperature of 30°C for the rest of the experiments.

8.4.6 Selection of optimal nitrogen source and phosphate buffer composition

The results of the preliminary screening for various nitrogen and phosphorus sources are shown in **Figure 8.8**. Among the six nitrogen sources we tested, a significant difference was observed for the rhamnolipid production when the cultures were performed with NaNO_3 (**Fig 8.8A**). However, we expected a better results for the cultures performed with urea since this nitrogen source was the best one for rhamnolipid production in *B. glumae* (Costa *et al.*, 2011, Nickzad *et al.*, 2018).

Regarding the phosphate buffer composition, none of the six combinations we tested has a significant effect on the rhamnolipid production (**Fig 8.8B**).

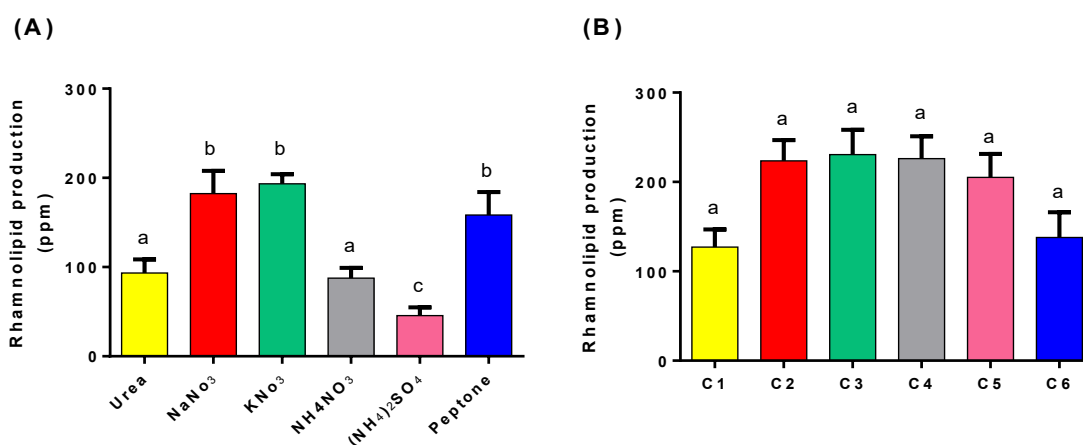


Figure 8.8 : Production of rhamnolipids for *B. thailandensis* E264 grown on different nitrogen (A) or phosphorus (B) sources.

Cultures were performed in PA14 medium with fixed concentration of EtOH (0.8M), at 30°C during five days, with an agitation at 200 rpm. Nitrogen sources were added at 20mM except for the peptone, which was added at a standard concentration used in industry (5g/L). Phosphorus sources were added as represented in the table in the experimental part (**Table 8.1**). Statistical difference was determined using an ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The error bars indicate the standard error of the mean ($n = 4$).

Based on these observation NaNO_3 and the combination 3 of phosphorous salts were chosen for the next steps of the optimization plan. Once we fixed temperature, carbon, nitrogen and phosphorus sources, the value of rhamnolipid production was 230 ppm under non optimized conditions.

8.4.7 Implementation of Taguchi design

The experimental design for 16 runs at two levels for each factor along with mean values of responses for three replicates (\pm standard deviation) is presented in **Figure 8.9**.

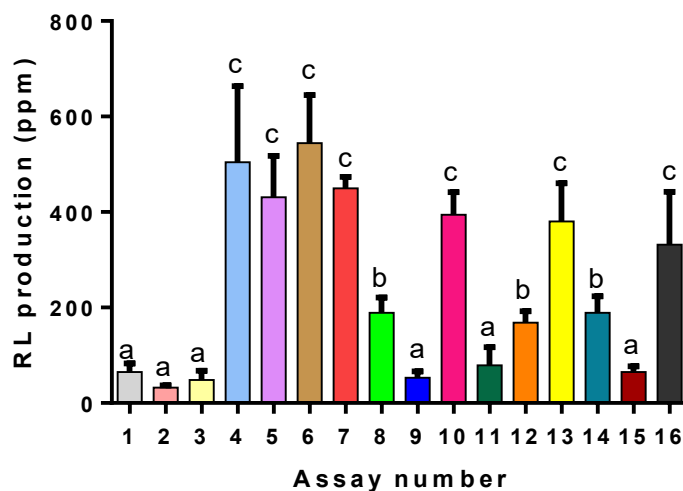


Figure 8.9: Experimental design and results of the L16 Taguchi table for rhamnolipid production.

The sixteen runs were performed at 30°C during 5 days with an agitation at 200rpm following the Taguchi table described in the Section 8.3.9. Statistical difference was determined using an ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). The error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$).

8.4.8 Data analysis and optimization

Data sets of responses for rhamnolipid production were explored to identify optimum operating conditions. Based on the obtained responses for each run, the effect of each factor was calculated following the level average analysis. The mean value of all runs is 245 ppm. Detailed results describing the effect of each factor are presented in **Table 8.3**.

The first observation we can make here is that the pH is important for rhamnolipids production if *B. thailandensis* E264. Indeed, when 200 mM HEPES buffer was added in the culture medium, causing a stabilization of the pH during the culture at a value of 7.00, rhamnolipid production was increased.

The concentration of the carbon source had an impact too, since a better production of rhamnolipid was obtained when *B. thailandensis* was cultured with 0.8M ethanol instead of 0.4M. Ethanol was already used as feedstock for rhamnolipid production in *P. aeruginosa*, allowing a better rhamnolipid production compared to other substrates such as glycerol, rape seed oil or glucose (Matsufuji *et al.*, 1997). We wanted to evaluate if ethanol could be a better substrate for increasing the rhamnolipid production because it could be used as an antifoam and so represent an advantage for the implementation of a process of biosurfactant production as demonstrated for *P. aeruginosa* (Sha *et al.*, 2012).

The addition of yeast extract in the medium does not play an important role for the rhamnolipid biosynthesis. The use of yeast extract as nitrogen source was already studied in *P. aeruginosa*, resulting in a diminution of the rhamnolipid production (Luis Guerra-Santos *et al.*, 1984a). We wanted to test the addition of yeast extract in order to reduce the lag phase in the cultures we performed in minimal medium. Since that seems to not affect the rhamnolipid production, we can consider the use of yeast extract in a small concentration.

On the other hand, the addition of trace element solution promoted the production. Interestingly, the opposite effect has been observed in *B. glumae*. Indeed a recent study showed that the trace elements positively affected the bacterial growth but prevent the rhamnolipid biosynthesis (Nickzad *et al.*, 2018).

Then the limitation in NaNO_3 , CaCl_2 and phosphate promoted the rhamnolipid pathway since we obtained better results at the low level corresponding to these factors.

Surprisingly, our study revealed that the higher concentration of MgSO_4 allows a better production of rhamnolipid in *B. thailandensis*. In contrast with that, the optimization work for

rhamnolipid production in *B. glumae* demonstrated that $MgSO_4$ did not affect the biosurfactant synthesis (Nickzad *et al.*, 2018).

Tableau 8.3: Effect of each factor in the L16 design on the rhamnolipid production by *B. thailandensis* E264

	HEPES	Carbon	NaNO ₃	MgSO ₄	TES	CaCl ₂	YE	Phosphorus
Level 1	-33.73	-77.25	15.92	-48.94	-78.58	20.07	-5.61	98.3
Level 2	33.73	77.25	-15.92	48.94	57.75	-20.07	5.61	12.59

Unfortunately, it seems that some significant interactions between factors are present in our model, judging by the effect we can attribute to the other columns of the matrix and presented in the **Table 8.4**. Indeed, if no interaction was detected, the values associated for each column would be close to zero. Instead, we observed a major interaction for the columns 3 (HEPES/Carbon), 5 (HEPES/NaNO₃), 6 (Carbon/NaNO₃) and 7 (MgSO₄/phosphate).

Tableau 8.4: Effect associated to the factor corresponding to interactions in the chosen Taguchi's design.

Column	3	5	6	7	9	11	14
Level 1	-43.29	-30.44	-69.73	51.18	14.35	-13.45	9.58
Level 2	43.29	30.44	47.79	-51.18	-14.35	13.45	-9.58

8.4.9 Validation assay

The best level for each factor was selected, giving a theoretical value based on the fact that the individual effects are cumulative in this kind of experiments. The values in bold in the **Table 8.5** represent the level of each factor leading to an enhancement of the rhamnolipid production.

Tableau 8.5: Best combination for the optimization of rhamnolipid production

	HEPES	EtOH	NaNO3	MgSO4	TES	CaCl2	YE	Phosphorus
Level 1	-33.73	-77.25	15.92	-48.94	-78.58	20.07	-5.61	98.3
Level 2	33.73	77.25	-15.92	48.94	57.75	-20.07	5.61	12.59

To validate the optimization results predicted by the models, a shake flask experiment was carried out under predicted optimum culture conditions (**Tableau 8.5**) and the production of rhamnolipids was determined. The observed experimental values (mean of triplicates) and values predicted by the equations of the models are presented in **Table 8.6**. The confirmation run did not allow to reach the predicted value of rhamnolipid production, suggesting that some interactions take place between the factors. However, the implementation of the Taguchi's table and more precisely the L16 table demonstrated that this method is effective because we obtained a higher value for rhamnolipid production compared to the initial conditions we studied.

Tableau 8.6: Experimental values of responses upon using optimum conditions as predicted by Taguchi design.

Response	Value before optimization	Predicted value	Mean experimental value
RL (ppm)	230	817.15	557.52

8.5 Conclusion

For the first time, ethanol was used for the optimization of rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis*. Although the results were not comparable to those obtained in rich medium with glycerol, this study highlighted some information about the importance of factors, which deserves to be further investigated. For instance, the addition of HEPES in the culture medium led to an increase in the rhamnolipid production, meaning pH plays a role in the rhamnolipid biosynthesis. Interestingly, we note that some interactions designed in our model actually involved the pH. Indeed, the factors 3, 5, 9, 11 and 14 correspond to the interactions between the pH and carbon, NaNO₃, MgSO₄, TES and phosphate, respectively, meaning the pH could be the main factor responsible for the incomplete validation of the confirmation run.

However, the best combination obtained during the experimental plan is encouraging since the rhamnolipid production was more than the double of the one obtained under non-optimized condition.

By its anti-foam property, ethanol could be considered as an asset for fermentation strategies. Indeed, one of the main issues encountered during fermentation for biosurfactant production is the foam formation under free cell aerobic conditions, which reduces the productivity of the process. Cultivation on an ethanol containing medium could be a good alternative to the use of traditional anti-foam, which increase the viscosity of the medium and so alter the gas exchanges. In addition, traditional antifoams appear inefficient since the foams in rhamnolipid fermentation was extremely fast and were too stable for these methods (Noh *et al.*, 2012). Since the ethanol is a feedstock for *B. thailandensis*, cultivation with two co-substrates could be considered, for instance by adding ethanol as a constituent of the feed medium during fed-batch strategies.

8.6 Funding informations

This work was supported by Discovery grant award number RGPIN-2015-03931 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

8.7 Acknowledgements

Thanks to Marie-Anne Gauriat for the explanation of Taguchi's tables.

8.8 Présentation des résultats additionnels de l'article

Le fait que *B. thailandensis* soit également un producteur de PHAs a été mis en évidence après les essais préliminaires visant à déterminer la nature des sources de carbone, d'azote et de phosphore, ainsi que la température optimale pour la production de rhamnolipides. Cependant, les rhamnolipides et les PHAs partageant le même *pool* de précurseurs, nous avons présumé que les besoins nutritifs et/ou physicochimiques nécessaires pour la biosynthèse de ces deux métabolites sont similaires. Nous avons décidé d'inclure la quantification des PHAs dans les réponses mesurées lors de la réalisation des essais de la table de Taguchi.

8.8.1 La production de PHA comme autre réponse étudiée dans le plan d'expérience

Les PHAs ont été quantifiés comme décrit dans (**Section 3**).

8.8.2 Bilan de la production des PHA dans le plan d'expérience réalisé

A la fin des 16 essais réalisés pour le plan d'expérience décrit précédemment, les PHAs contenus dans les cellules ont été quantifiés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8.7**.

Tableau 8.7: Experimental design and results of the L16 Taguchi table for PHA production.

("-"=absence; "+"=presence)

N essai	HEPES (200 mM)	EtOH (M)	NaNO ₃ (mM)	MgSO ₄ (mM)	TES (2 ml/L)	CaCl ₂ (mM)	YE (5 g/L)	Phosphates (mM)	PHA (RFU)
1	-	0.4	20	1.6	-	0.9	-	25	3532.6±94.6
2	-	0.4	20	3.2	+	1.8	+	50	7376.7±930.9
3	-	0.4	100	1.6	-	1.8	+	50	1865.5±493.1
4	-	0.4	100	3.2	+	0.9	-	25	4559±809.7
5	-	0.8	20	1.6	+	0.9	-	50	4647.7±544.1

6	-	0.8	20	3.2	-	1.8	+	25	9839,3±886.9
7	-	0.8	100	1.6	+	1.8	+	25	8747,3±1147.8
8	-	0.8	100	3.2	-	0.9	-	50	3742,6±164.2
9	+	0.4	20	1.6	-	0.9	+	50	7712,6±748.5
10	+	0.4	20	3.2	+	1.8	-	25	3953,6±292.9
11	+	0.4	100	1.6	-	1.8	-	25	2869,6±91.8
12	+	0.4	100	3.2	+	0.9	+	50	5837,3±1345.7
13	+	0.8	20	1.6	+	0.9	+	25	6831,3±882.5
14	+	0.8	20	3.2	-	1.8	-	50	3633±173.5
15	+	0.8	100	1.6	+	1.8	-	50	2638±297
16	+	0.8	100	3.2	-	0.9	+	25	6088,6±391

8.8.1 Analyse des résultats et optimisation

Après l'analyse des résultats expérimentaux et le calcul des effets associés à chaque facteur (**Tableau 8.8**), nous avons pu identifier la meilleure combinaison théorique pour l'optimisation de la biosynthèse du polymère.

L'effet le plus important sur la production de PHA est celui attribué à l'addition d'extrait de levure dans le milieu de culture. Il a déjà été démontré que l'extrait de levure a un effet positif sur la production de PHAs chez d'autres espèces bactérienne comme *Bacillus subtilis* (Shah, 2014), *Bacillus cereus* (Aly *et al.*, 2013) ou encore certaines bactéries marines (Rawte *et al.*, 2004).

La plus grande concentration en carbone favorise la production des PHAs, ce qui est cohérent puisque ce sont des métabolites dont la biosynthèse est favorisée en cas d'excès de substrat carboné.

On notera également que les limitations en phosphate, CaCl_2 et NaNO_3 sont favorables à la production des PHAs, ce qui est en accord avec les données retrouvées dans la littérature (Koller *et al.*, 2010a, Wen *et al.*, 2010). En revanche, tout comme observé pour la production des rhamnolipides, la limitation en ion Mg^{2+} apportés par le MgSO_4 a un effet négatif sur la synthèse des PHA, ce qui est surprenant dans la mesure où cet ion fait partie des éléments dont la limitation affecte positivement la production de PHA chez d'autres bactéries (Anderson *et al.*, 1990b).

Même si les meilleures valeurs de production de PHAs ont été obtenus pour les runs 6 et 7, ne contenant pas d'HEPES, il semble malgré tout d'après le calcul des effets de chacun des facteurs que l'ajout d'HEPES, visant à stabiliser le pH pendant la culture s'avère également positif pour la production des PHAs. Le pH a régulièrement été décrit comme jouant un rôle dans la production de PHAs dans différents procédés (Li *et al.*, 2016, Villano *et al.*, 2010). Il est probable qu'un pH optimal existe chez *B. thailandensis* afin de favoriser la biosynthèse des PHAs.

Tableau 8.8: Effet associé à chacun des facteurs testés

	Hepes	Carbon	NaNO3	MgSO4	TES	CaCl2	YE	Phosphate
Level 1	-296,65	-528.81	698.69	-386,60	-877.30	126,81	-1545,15	560,52
Level 2	296.65	528.81	-698.69	386,60	331,69	-126,81	1545,15	-410,19

En revanche on notera également que des interactions entre facteurs ont des effets sur la production des PHAs, comme présenté dans le **Tableau 8.9**

Tableau 8.9: Effet associés aux interactions entre facteurs

Factor	3	5	6	7	9	11	14
Level 1	-676.6	111.56	-376.37	79.15	-453.78	-462.15	560.52
Level 2	676.6	-111.56	231.85	-79.15	453.78	462.15	-410.19

8.8.2 Essai de confirmation

L'essai de confirmation a été réalisé dans les conditions présentées dans le **Tableau 8.10**, correspondant au niveau de chaque facteur qui a permis la meilleure production de PHA.

Tableau 8.10: Identification de la meilleure combinaison de facteur pour une production de PHA théorique optimale

Les paramètres sélectionnés sont présentés en gras

	Hepes	Carbon	NaNO3	MgSO4	TES	CaCl2	YE	Phosphate
Level 1	-296,65	-528.81	698.69	-386,60	-877.30	126,81	-1545,15	560,52
Level 2	296.65	528.81	-698.69	386,60	331,69	-126,81	1545,15	-410,19

A la fin de l'essai de confirmation, les PHAs produits ont été quantifiés et comparés à la valeur prédite comme optimale. Malheureusement, le résultat obtenu est inférieur à la valeur théorique calculée (**Tableau 8.11**) mais reste une des plus grosses valeurs obtenues dans le plan d'expérience.

Tableau 8.11: Résultat de la quantification des PHAs de l'essai de confirmation

Response	Predicted value	Mean experimental value
PHA (rfu)	11586	9781.67

8.9 Conclusions générales

De façon intéressante, on note que la meilleure combinaison pour la production des rhamnolipides est la même que celle obtenue pour l'optimisation de la production des PHAs. Cette observation va dans le sens que la biosynthèse des PHAs contribuerait à celle des rhamnolipides *via* la dégradation du polymère.

9 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'objectif principal de cette thèse était l'optimisation de la production des rhamnolipides chez la bactérie *B. thailandensis*. En effet dans un contexte où les procédés industriels pour la production de biosurfactants d'origine microbienne sont difficilement viables à cause des rendements trop faibles et des coûts reliés au confinement, à la purification ou aux matières premières, il est important de trouver des alternatives pour pouvoir à terme remplacer les surfactants d'origine chimique. C'est pourquoi *B. thailandensis* représente un bon candidat pour la mise en place de procédés microbiens de production. En effet, c'est une bactérie ne demandant qu'un niveau 1 en termes de biosécurité, qui produit naturellement un congénère majoritaire de rhamnolipides, facilitant les étapes de purification subséquentes à la fermentation. Malheureusement, la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides est méconnue chez cette bactérie, ce qui a conduit à la mise en place de différents outils dans ce projet, afin de découvrir de nouvelles pistes pour augmenter la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

Tout travail d'optimisation peut être réalisé par trois leviers. En effet, le travail sur la souche en elle-même constitue un premier défi, dans le sens où l'objectif sera d'augmenter les capacités mêmes de la bactérie à produire davantage de la molécule d'intérêt. Cette approche visant à augmenter le potentiel de biosynthèse permet de révéler des régulateurs au niveau cellulaire. Dans un second temps, le travail sur le milieu de culture va viser à identifier les éléments du milieu de culture qui favorisent la production des rhamnolipides. Enfin, le travail sur le procédé de fermentation permettra de mettre en place les paramètres physico-chimiques et la stratégie de fermentation nécessaires à l'obtention de meilleurs rendements de production. J'ai essayé au cours de ce projet de recherche de mener des études sur chacun de ces trois volets.

Dans un premier temps, j'ai mis en place deux stratégies distinctes pour optimiser le potentiel de production de *B. thailandensis*. En effet, j'ai d'abord réalisé une mutagenèse aléatoire qui a permis la mise en évidence de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides, notamment *scmR*, qui a fait l'objet du **Chapitre 3**. Cette approche menant à l'obtention d'organismes génétiquement modifiés, ce qui peut représenter un problème pour certaines compagnies, j'ai également employé une approche moins conventionnelle, basée sur le principe d'évolution dirigée et qui repose sur la sélection naturelle. Là encore j'ai pu sélectionner des souches portant des mutations dans des gènes entraînant la surproduction des rhamnolipides, comme *qsmR*, qui a fait l'objet du **Chapitre 4**. J'ai décidé de concentrer cette étude sur les régulateurs ScmR ou QsmR pour deux raisons distinctes. Concernant ScmR,

l'inactivation de cette protéine menait à l'obtention de la souche produisant le plus de rhamnolipides parmi les transposants sélectionnés. D'autre part, le choix d'approfondir les connaissances sur la relation entre QsmR et la production de rhamnolipides repose sur le fait que les mutations générées par les expériences d'évolution dirigée convergeaient vers ce régulateur puisque la moitié des souches séquencées portaient une ou plusieurs mutations dans le gène codant ce régulateur. Cependant, dans l'une ou l'autre des stratégies mises en place, d'autres gènes se sont révélés impliqués dans la modulation de la biosynthèse des rhamnolipides et seraient donc des cibles potentielles pour de futurs travaux visant la caractérisation de nouveaux régulateurs. Parmi eux citons notamment le gène BTH_II0885, codant pour un régulateur transcriptionnel de type TetR, qui présentait la meilleure production de rhamnolipides parmi les évolutifs. De plus la mutagenèse aléatoire a aussi démontré que l'inactivation de trois gènes appartenant au système de sécrétion de type VI entraînait des modifications dans la production des rhamnolipides. De façon intéressante, l'un des mutants issus de l'évolution dirigée porte une mutation dans le gène *cpIV5*, qui appartient également au système de sécrétion de type VI. Une étude plus approfondie permettrait de déterminer quel rôle joue le système de sécrétion de type VI dans la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

Probablement parce que le criblage n'a couvert qu'environ 50% du génome de *B. thailandensis*, nous n'avons pas trouvé de transposon inséré dans des gènes du *quorum sensing* ou bien de la biosynthèse des PHAs alors que nous avons mis en évidence dans les chapitres 4 et 7 que ceux-ci jouaient un rôle dans la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*. En effet, le nombre de mutants à cribler pour couvrir la totalité du génome serait d'environ 50000 (**Section 12 : Annexe 2**) alors que j'ai criblé à peu près 25000 clones.

Un autre constat intéressant a été fait pour le mutant *qsmR*⁻. En effet, ce mutant présente un phénotype surproducteur de rhamnolipides mais sa production de PHA n'est pas altérée comme observé pour les mutants *scmR*⁻ ou $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$, suggérant que le mécanisme relié à l'augmentation de la production de rhamnolipides chez le mutant *qsmR* est différent et ne passerait pas par le gain en précurseur lié à la dégradation des PHAs. Cela va dans le sens de l'hypothèse avancée selon laquelle QsmR régulerait le transport des rhamnolipides vers l'extérieur de la cellule. Malheureusement je n'ai pas pu identifier la cible de type *toIC* qui pourrait être associée au système d'export codé par les gènes *mdtABC* composant l'opéron auquel *qsmR* appartient. Cependant j'ai réalisé des recherches d'homologies avec des gènes *toIC* au sein de *B. thailandensis* et de façon intéressante, j'ai découvert qu'un gène homologue à *toIC* retrouvé chez *Ralstonia solanacearum* (RS_RS19280) présentait un pourcentage d'identité de 83% sur

une longueur de 58 paires de bases avec les gènes BTH_II1080 et BTH_II1876, qui sont identiques et que l'on retrouve dans chacun des deux opérons *rhl* de *B. thailandensis* respectivement, codant potentiellement pour une lipoprotéine appartenant à un système d'export de type RND (Resistance Nodulation cell Division). Il serait donc intéressant d'étudier le double mutant de ces gènes, Δ BTH_II1080 Δ BTH_II1876, et d'évaluer l'impact sur la production des rhamnolipides afin de déterminer si l'exportation des rhamnolipides se fait par cette voie. Dans l'idéal il faudrait réaliser la même étude en inactivant dans la même souche le système *mdtABC* et les gènes de type *to/C* BTH_II1080 et BTH_II1876.

J'ai fait la découverte, de façon simultanée avec Funston *et al* (2017), que *B. thailandensis* produit des PHAs, ce qui a élargi le projet de recherche puisque les rhamnolipides et les PHAs sont souvent étudiés de pair du fait de leur origine métabolique commune. En effet, tous deux étant composés de chaînes d'acides gras, plusieurs études ont suggéré une compétition entre ces deux métabolites. Même si aucun résultat probant n'a à ce jour été publié, il semblerait malgré tout que les PHAs et les rhamnolipides partagent le même *pool* de précurseurs lipidiques. Afin de vérifier comment ces métabolites sont reliés, j'ai étudié dans le **Chapitre 6** la production de PHA et de rhamnolipides chez des mutants incapables de produire des rhamnolipides ou des PHAs, respectivement. Ainsi j'ai démontré que les deux voies métaboliques n'étaient pas en concurrence puisque la souche déficiente pour la production de rhamnolipides ne produisait pas davantage de PHAs, et inversement la souche déficiente pour la production de PHAs ne produisait pas davantage de rhamnolipides en milieu riche. Au contraire, en milieu minimal, l'étude de la souche ne produisant plus de PHA réduisait la production de rhamnolipides, suggérant que les rhamnolipides pourraient dépendre de la synthèse des PHAs. L'étude du mutant *phaZ*- a appuyé cette hypothèse car la production de rhamnolipides est également réduite lorsque *B. thailandensis* n'est plus capable de dégrader les PHAs. Il est certain que la dépolymérisation des PHAs est un mécanisme important qui pourrait jouer un rôle dans les flux métaboliques (Ren *et al.*, 2009). J'ai de plus mis évidence que la surproduction de rhamnolipides chez un mutant *phaR*- serait liée à une augmentation de l'expression du gène codant pour la PHA-dépolymérase, confirmant ainsi que la synthèse et à la dégradation des PHAs contribueraient à la production des rhamnolipides.

Des données préliminaires non publiées obtenues dans le laboratoire Déziel suggéraient une répression des rhamnolipides par le *quorum sensing* (Humery, 2013). Les deux techniques visant l'optimisation de la souche *B. thailandensis* ont mis en évidence des régulateurs pouvant être reliés au *quorum sensing*. C'est pourquoi j'ai étudié les mutants du *quorum sensing* dans le

Chapitre 7. Malheureusement, pendant la rédaction, un article aboutissant aux mêmes conclusions que nous a été publié (Irorere U *et al.*, 2019). En effet, cet article a établi que le triple mutant $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3$ du *quorum sensing* entraînait une diminution de la production de PHAs et une augmentation de la production de rhamnolipides, en accord avec nos propres résultats. En revanche j'ai poussé un peu plus notre étude en identifiant le système de *quorum sensing* BtaRI3 comme étant responsable de ce phénotype. De plus nous avons confirmé dans nos conditions que l'activation de *scmR* est *quorum sensing*-dépendante. Cependant la production de rhamnolipides chez le mutant *scmR* est plus importante que chez le triple mutant du QS, signifiant que d'autres mécanismes de régulation sont impliqués. Il pourrait être intéressant d'étudier un quadruple mutant $\Delta bta1\Delta bta2\Delta bta3\Delta scmR$ pour vérifier si un effet cumulatif serait observé pour la production des rhamnolipides et des PHAs.

Le but général de ce projet était d'optimiser la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Comme mentionné précédemment, le milieu de culture est un élément clé pour la mise en place de procédés à échelle industrielle. Plus précisément, il est important de définir un milieu minimal, qui sera plus avantageux en termes de coûts qu'un milieu riche. J'ai donc mis au point un milieu minimal dans le **Chapitre 8**. Malheureusement ce milieu minimal optimisé n'a pas permis d'atteindre les concentrations de rhamnolipides obtenues en milieu riche. Le milieu riche utilisé est le milieu Nutrient Broth, constitué d'extrait de bœuf et de peptone, que nous complétons avec en général 2% ou 4% de glycérol. Ce milieu apporte donc beaucoup plus de carbone que le milieu minimal que nous avons mis en place, basé sur une faible quantité d'éthanol du fait de la toxicité de ce produit sur les cellules à trop haute concentration. Ce problème pourrait être résolu en mettant en place une fermentation en mode fed-batch où l'éthanol serait apporté dans le feed. Cette stratégie serait la meilleure car l'éthanol a également été choisi pour ses propriétés d'anti-mousse. Or en tant que source de carbone il va être consommé pendant la culture, et donc l'alimentation continue en éthanol serait indispensable. Les données obtenues sur les effets des autres éléments composant le milieu minimal sont cohérentes avec la littérature relatant l'optimisation de la production de rhamnolipides chez d'autres microorganismes (Costa *et al.*, 2011, Nickzad *et al.*, 2018). En effet, les limitations en azote, phosphate et calcium sont des facteurs favorisant la production des PHAs et les rhamnolipides chez *B. glumae*. En revanche j'ai été surprise des observations réalisées concernant la concentration en $MgSO_4$, qui favoriserait la production des PHAs et des rhamnolipides dans la valeur haute de ce facteur alors que le contraire a été rapporté pour *B. glumae* (Nickzad *et al.*, 2018). Il serait intéressant de reproduire un plan de Taguchi en définissant de nouvelles bornes pour les intervalles de concentration étudiées.

Une limite de ce travail serait que la totalité des analyses LC/MS visant la quantification des rhamnolipides a été réalisée par le suivi de la masse du congénère majoritairement produit par *B. thailandensis*, à savoir le rha-rha-C14-C14. Cependant il aurait été pertinent de s'intéresser aux autres congénères synthétisés par la bactérie, afin de s'assurer que les modifications observées dans la production du rha-rha-C14-C14 ne se traduisaient pas par une modification des proportions des autres congénères, comme suggéré dans la littérature (Funston *et al.*, 2017). Par exemple, le manque de disponibilité en rhamnose par rapport au substrat lipidique pourrait mener à une augmentation de la biosynthèse de mono-rhamnolipides. De plus, le développement d'une méthode d'extraction et de quantification des PHAs aurait été souhaitable, mais les résultats obtenus dans les essais préliminaires n'étaient pas concluants, nécessitant davantage de mise au point.

En conclusion, l'objectif de ce projet de recherche était d'augmenter la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*. L'une des hypothèses de départ était que le manque de connaissance sur la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides était un frein au développement de procédés viables. J'ai réussi de différentes manières à mettre en évidence plusieurs régulateurs (**Fig 9.1**) dont l'implication directe ou non dans la production des rhamnolipides reste encore à démontrer. Ainsi sont tout d'abord représentées les machineries génétiques codant les enzymes responsables de la biosynthèse soit des rhamnolipides (en bleu) soit des PHAs (en rouge). Comme expliqué précédemment, ces deux métabolites semblent partager le même *pool* de précurseurs et à ce jour seule la FASII a été rapportée chez *B. thailandensis* comme fournissant les intermédiaires 3-hydroxyacyl-ACP pour la production des rhamnolipides (Irorere *et al.*, 2018), c'est pourquoi cette voie a été représentée sur le schéma comme principale source de précurseurs. Chacun des mécanismes de régulation qui ont été mis en évidence dans les différents chapitres de cette thèse sont ensuite rapportés. Dans un premier temps, le chapitre 4, dans lequel a été décrite la stratégie de mutagenèse aléatoire, a permis d'identifier ScmR et BetB. Ces deux systèmes sont présentés dans les cadres en pointillés gris. J'ai démontré que ScmR réprimait la production des rhamnolipides par une inhibition de la transcription de l'opéron *rhlA2*. Au contraire, la production de PHAs est favorisée par ce régulateur, reste maintenant à savoir par quel mécanisme. L'hypothèse avancée ici serait que ScmR réprime l'expression du gène *phaZ*, codant pour la PHA dépolymérase, empêchant donc la dégradation du polymère au profit de la production des rhamnolipides à partir des HA-CoA relargués. Le régulon Bet, et plus précisément BetB, est également impliqué dans la production des rhamnolipides. L'étude de la production de PHAs n'a pas été faite chez ces mutants. Cependant, les valeurs de DO₆₀₀ ne semblent pas indiquer de défaut de production de PHA, si

l'on part du principe que la densité optique est en fait un reflet de la production du polymère. Il faudrait vérifier cette hypothèse en quantifiant les PHAs dans le mutant *betB*⁻. De même il serait intéressant de vérifier si la mutation du gène *betB* a des répercussions au niveau transcriptionnel sur les opérons *rhIA1* et *rhIA2*. L'étude des rapporteurs de ces deux opérons dans la souche sauvage en condition d'activation du régulon *bet*, à savoir le choc osmotique ou l'ajout de choline, indique que l'expression des deux opérons est abolie.

L'utilisation de la méthodologie d'évolution dirigée a permis d'identifier QsmR, présenté dans la figure dans le cadre en pointillés jaunes. Ce régulateur de type IclR serait directement impliqué dans la biosynthèse des rhamnolipides puisque j'ai démontré grâce aux rapporteurs des opérons *rhIA1* et *rhIA2* que la transcription des deux opérons est augmentée dans un mutant *qsmR*⁻, en particulier *rhIA2*. Cependant la production de PHAs n'est quant à elle pas affectée. De plus, la prédiction de l'organisation en opéron de *qsmR* avec des homologues du système de transport *mdtABC* suggère que celui-ci pourrait être impliqué dans le transport des rhamnolipides, qui n'a jamais été mis en évidence. Enfin des études bio-informatiques permettent d'envisager que le régulateur QsmR pourrait se lier avec des molécules de signalisations telles que les AHLs retrouvées chez *B. thailandensis*, suggérant une régulation de ce régulateur par le QS.

L'étude plus approfondie des mutants des gènes impliqués dans la synthèse ou la régulation des PHAs a identifié PhaZ comme une enzyme clé dans l'équilibre entre la production de PHAs et celle des rhamnolipides (cadre en pointillés marron). Ainsi si le modèle proposé s'avère juste, la dépolymérisation des PHAs serait une source de précurseurs pour la production de rhamnolipides. Cette hypothèse a pu être avancée grâce à l'étude du mutant *phaR*⁻, chez qui la production des rhamnolipides est augmentée alors que la biosynthèse des PHAs est diminuée.

Finalement, le chapitre traitant des interactions entre le QS, ScmR et les systèmes de production des PHAs et des rhamnolipides est présentés dans les cadres en pointillés bleu-vert. L'activation de la transcription de *scmR* par le QS a été validée dans nos conditions de cultures. Le système de QS 3 a été identifié comme jouant un rôle aussi bien dans la production des rhamnolipides et dans celle des PHAs puisqu'il inhibe la première et favorise la seconde. Cependant la transcription de *scmR* ne serait pas liée exclusivement à une activation par le QS, comme démontré par l'étude du mutant cumulatif *scmR-btaI3*⁻.

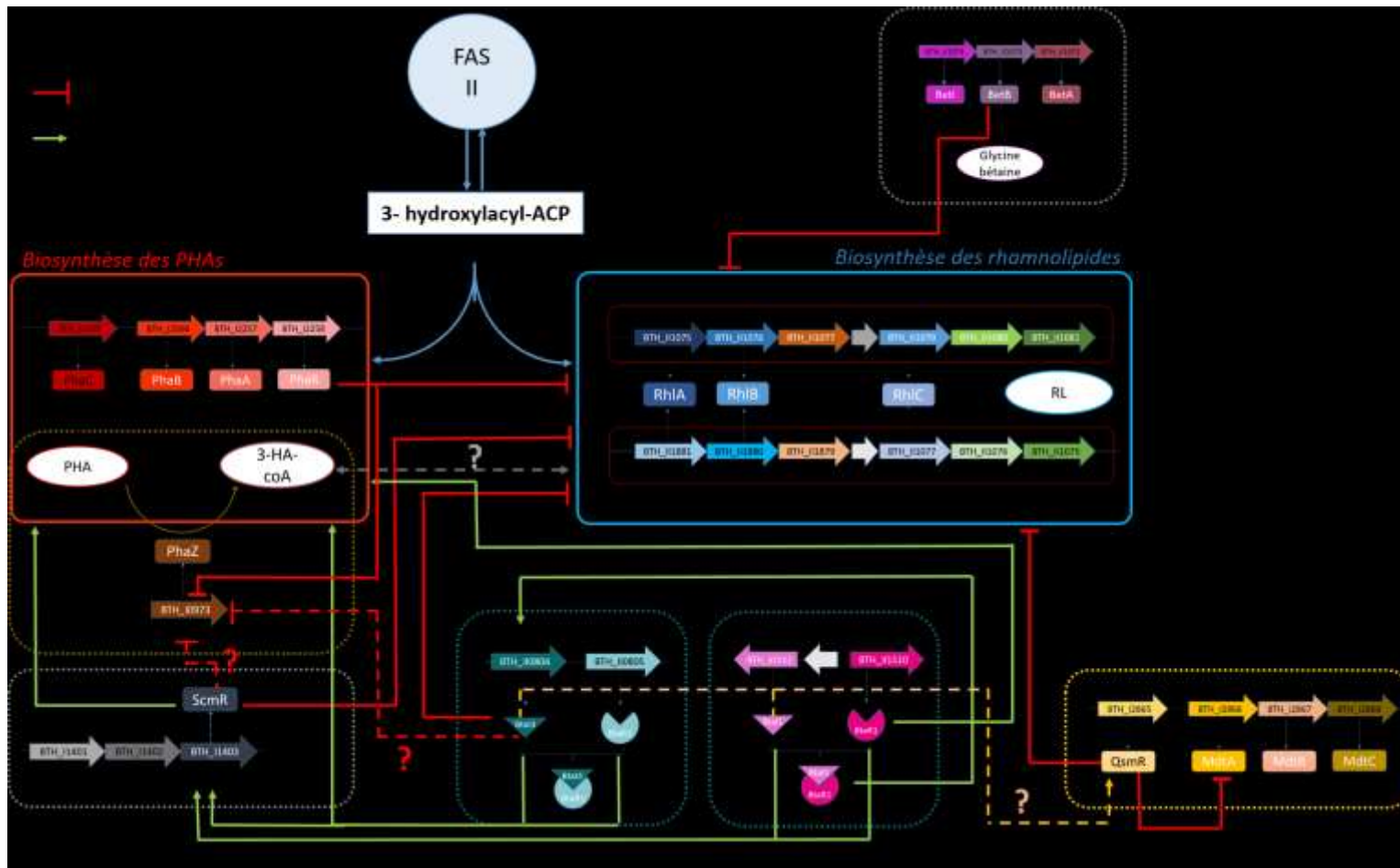


Figure 9.1 : Schéma général des régulateurs mis en évidence pendant le doctorat

Les cadres pleins correspondent aux voies métaboliques codant respectivement pour la biosynthèse, en rouge, des PHAs et, en bleu, des rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Chaque cadre en pointillés correspond à un mécanisme de régulation mis en évidence dans les différents chapitres de cette thèse. Ainsi les deux cadres pointillés gris correspondent aux régulateurs mis en évidence dans le chapitre 4, à savoir ScmR et BetB. Le cadre pointillé jaune correspond à celui découvert dans le Chapitre 5 : QsmR. Le cadre pointillé marron illustre la voie de la dépolymérisation des PHAs présentée dans le Chapitre 6, et enfin le cadre pointillé vert représente les résultats obtenus dans l'étude du QS menés dans le Chapitre 7, dans lequel le système Btal/R3 a été identifié comme jouant un rôle dans la production des rhamnolipides et des PHAs. Les flèches vertes et rouges indiquent une activation ou au contraire une inhibition des systèmes, respectivement. Les points d'interrogation sur les flèches en pointillés indiquent que des expériences restent à faire pour valider l'hypothèse du mécanisme avancé.

Ainsi, les expériences réalisées au cours de ce projet de doctorat m'ont permis d'obtenir des souches produisant jusqu'à 5 fois plus de rhamnolipides que la souche sauvage, ce qui est encourageant, tant pour la connaissance des mécanismes de régulation que pour la mise en place de procédés de production à plus grande échelle. De plus, j'ai aussi démontré que selon les gènes mutés, la surproduction de rhamnolipides s'accompagnait d'une baisse de la production des PHAs, comme observé pour les mutants des gènes *scmR* ou *btaI3/R3*. En revanche ce constat n'est pas valable pour le mutant *qsmR* et serait à vérifier pour les autres mutants mis en évidence au cours de la mutagenèse aléatoire ou de l'évolution dirigée. Cela suggère que la surproduction des rhamnolipides pourrait être liée par différents mécanismes, comme par exemple la dépolymérisation des PHAs, ou encore une amélioration du système d'export des rhamnolipides.

Toujours dans une optique de développement industriel, j'ai défini un milieu minimal qui permet la production des rhamnolipides. Bien que la production de rhamnolipides dans ce milieu ne soit pas aussi importante que le milieu riche habituellement utilisé dans la littérature, il constitue une base solide pour poursuivre l'optimisation et cohérente avec les besoins cellulaires pour la synthèse des rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

10 BIBLIOGRAPHIE

- Abalos A, Pinazo A, Infante M, Casals M, Garcia F & Manresa A (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17(5):1367-1371.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology* 86(5):1323-1336.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014) A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem. Biol.* 21(1):156-164.
- ADEME–AGRICE R (2001) Tensioactifs et Oléagineux. (novembre).
- Agarwal A, Kahyaoglu C & Hansen DB (2012) Characterization of HmqF, a protein involved in the biosynthesis of unsaturated quinolones produced by *Burkholderia thailandensis*. *Biochemistry* 51(8):1648-1657.
- Ahn SK, Cuthbertson L & Nodwell JR (2012) Genome context as a predictive tool for identifying regulatory targets of the TetR family transcriptional regulators. *PLoS One* 7(11):e50562.
- Al-Tahhan RA, Sandrin TR, Bodour AA & Maier RM (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3262-3268.
- Albuquerque M, Torres C & Reis M (2010) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water research* 44(11):3419-3433.
- Alexis J (1995) *Pratique industrielle de la méthode Taguchi: les plans d'expériences*. Afnor,
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25(17):3389-3402.
- Aly MM, Albureikan MO, El Rabey H & Kabli SA (2013) Effects of culture conditions on growth and poly- β -hydroxybutyric acid production by *Bacillus cereus* MM7 isolated from soil samples from Saudi Arabia. *Life Sci J* 10(4):1884-1891.
- Anderson AJ & Dawes EA (1990a) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 54(4):450-472.
- Anderson AJ & Dawes EA (1990b) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews* 54(4):450-472.
- Andrä J, Rademann J, Howe J, Koch MH, Heine H, Zähringer U & Brandenburg K (2006) Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biological chemistry* 387(3):301-310.
- Anes J, McCusker MP, Fanning S & Martins M (2015) The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology* 6:587.
- Arino S, Marchal R & Vandecasteele J-P (1996) Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45(1-2):162-168.
- Babel W, Ackermann J-U & Breuer U (2001) Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly (3HB). *Biopolyesters*, Springer. p 125-157.
- Bahia FM, de Almeida GC, de Andrade LP, Campos CG, Queiroz LR, da Silva RLV, Abdelnur PV, Corrêa JR, Bettiga M & Parachin NS (2018) Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports* 8(1):2905.

- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ & Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology* 87(2):427-444.
- Banat IM, Makkar RS & Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology* 53(5):495-508.
- Barquist L, Boinett CJ & Cain AK (2013) Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA biology* 10(7):1161-1169.
- Basler á, Pilhofer á, Henderson G, Jensen G & Mekalanos J (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483(7388):182.
- Bassler BL & Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125(2):237-246.
- Bazsefidpar S, Mokhtarani B, Panahi R & Hajfarajollah H (2019) Overproduction of rhamnolipid by fed-batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* in a lab-scale fermenter under tight DO control. *Biodegradation* 30(1):59-69.
- Beal R & Betts W (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 89(1):158-168.
- Becher P (1965) Emulsions: theory and practice.
- Běhal V (1986) Enzymes of secondary metabolism in microorganisms. *Trends Biochem. Sci.* 11(2):88-91.
- Bergström S, Theorell H & Davide H (1947) *On a metabolic Product of Ps. pyocyanea, pyolipic acid, active against nycobact. tuberculosis.* Almquist & Wiksell,
- Bernd H (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* 376(1):15-33.
- Beuker J, Barth T, Steier A, Wittgens A, Rosenau F, Henkel M & Hausmann R (2016) High titer heterologous rhamnolipid production. *AMB Express* 6(1):124.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M & Bordoli L (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research* 42(W1):W252-W258.
- Bible AN, Fletcher SJ, Pelletier DA, Schadt CW, Jawdy SS, Weston DJ, Engle NL, Tschaplinski T, Masyuko R & Poliseti S (2016) A Carotenoid-Deficient Mutant in *Pantoea sp.* YR343, a bacteria isolated from the rhizosphere of *Populus deltoides*, is defective in root colonization. *Frontiers in microbiology* 7:491.
- Bourat G (1992) Fermentation, propriété des micro-organismes. *Techniques de l'ingénieur.*
- Braunegg G, Lefebvre G & Genser KF (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65(2-3):127-161.
- Brett P, Deshazer D & Woods D (1997) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiology and infection* 118(02):137-148.
- Brett PJ, DeShazer D & Woods DE (1998) *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International journal of systematic bacteriology* 48:317-320.
- Brigham CJ & Sinskey AJ (2012) Polyhydroxyalkanoate production enzymes: a survey and biological perspective. *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология* 5(3):220-242.
- Burch AY, Shimada BK, Browne PJ & Lindow SE (2010) Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Applied and environmental microbiology* 76(16):5363-5372.
- Burger M, Glaser L & Burton RM (1962) The synthesis of a rhamnolipid by enzyme preparations from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et biophysica acta* 56:172-174.
- Cabrera-Valladares N, Richardson A-P, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F & Soberón-Chávez G (2006) Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Applied microbiology and biotechnology* 73(1):187-194.

- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* 189(9):3603-3612.
- Caldas T, Demont-Caulet N, Ghazi A & Richarme G (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* 145(9):2543-2548.
- Chandler JR, Duerkop BA, Hinz A, West TE, Herman JP, Churchill ME, Skerrett SJ & Greenberg EP (2009) Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *Journal of bacteriology* 191(19):5901-5909.
- Chee J-Y, Yoga S-S, Lau N-S, Ling S-C, Abed RM & Sudesh K (2010) Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2:1395-1404.
- Chen G (2004) Rhamnolipid biosurfactant behavior in solutions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15(2):229-235.
- Chen S-Y, Wei Y-H & Chang J-S (2007) Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied microbiology and biotechnology* 76(1):67-74.
- Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho Y-H & Yoon SC (2011) Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative ¹³C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J. Biotechnol.* 151(1):30-42.
- Chou HH & Keasling JD (2013) Programming adaptive control to evolve increased metabolite production. *Nature communications* 4:2595.
- Colovos C & Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2(9):1511-1519.
- Costa S, Déziel E & Lépine F (2011) Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 53(6):620-627.
- Cuthbertson L & Nodwell JR (2013) The TetR family of regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(3):440-475.
- Dahrazma B, Mulligan CN & Nieh M-P (2008) Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): A small-angle neutron scattering (SANS) study. *J. Colloid Interface Sci.* 319(2):590-593.
- Davey ME, Caiazza NC & O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 185(3):1027-1036.
- De Almeida DG, Soares Da Silva RdCF, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Banat IM & Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in microbiology* 7:1718.
- Dekimpe V & Deziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155(3):712-723.
- Dennis JJ & Sokol PA (1995) Electrotransformation of *Pseudomonas*. *Electroporation Protocols for Microorganisms*, Springer. p 125-133.
- Desai JD & Banat IM (1997a) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular Biology reviews* 61(1):47-64.
- Desai JD & Banat IM (1997b) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1):47-64.
- Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA & Villemur R (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1440(2):244-252.

- Deziel E, Lepine F, Milot S & Villemur R (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149(8):2005-2013.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F & Bisailon J (1996) Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology* 62(6):1908-1912.
- Diggle SP, Cornelis P, Williams P & Cámara M (2006a) 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(2-3):83-91.
- Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Cámara M & Williams P (2006b) Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem. Biol.* 13(7):701-710.
- Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M & Williams P (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular microbiology* 50(1):29-43.
- Doggett RG, Harrison GM & Wallis ES (1964) Comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. *Journal of bacteriology* 87(2):427-431.
- dos Santos AS, Pereira Jr N & Freire DM (2015) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. (PeerJ PrePrints).
- Dragosits M & Mattanovich D (2013) Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories* 12(1):64.
- Du G, Chen J, Yin H, Gao H & Lun S (2000) Effects of nitrogen feeding on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate with *Alcaligenes eutrophus*. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica* 40(3):290-295.
- Dubeau D, Déziel E, Woods DE & Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC microbiology* 9(1):263.
- Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill ME, Parsek MR, Nierman WC & Greenberg EP (2009) Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 191(12):3909-3918.
- Dulcey C (2019) *Étude des mécanismes d'approvisionnement des précurseurs lipidiques des rhamnolipides et caractérisation mutationnelle de l'enzyme RhlA de Pseudomonas aeruginosa*. Phd (INRS-AFSB).
- Dumais J-P (2010) *Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez Burkholderia ambifaria et B. thailandensis*. (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Dunlap PV (1999) Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1):5-12.
- Durand A-A, Bergeron A, Constant P, Buffet J-P, Déziel E & Guertin C (2015) Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific reports* 5:17190.
- Escapa IF, Del Cerro C, García JL & Prieto MA (2013) The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ. Microbiol.* 15(1):93-110.
- Escapa IF, García JL, Bühler B, Blank L & Prieto MA (2012) The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 14(4):1049-1063.

- Forsyth W, Hayward A & Roberts J (1958) Occurrence of poly- β -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria.
- Fralick JA (1996) Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 178(19):5803-5805.
- Funston SJ, Tsaousi K, Rudden M, Smyth TJ, Stevenson PS, Marchant R & Banat IM (2016) Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. *Applied microbiology and biotechnology* 100(18):7945-7956.
- Funston SJ, Tsaousi K, Smyth TJ, Twigg MS, Marchant R & Banat IM (2017) Enhanced rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* transposon knockout strains deficient in polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis. *Applied microbiology and biotechnology* 101(23-24):8443-8454.
- Fuqua, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269.
- Fuqua C & Greenberg EP (2002) Signalling: listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3(9):685.
- Galán B, Dinjaski N, Maestro B, De Eugenio L, Escapa I, Sanz J, García J & Prieto M (2011) Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular microbiology* 79(2):402-418.
- Gallagher LA, Ramage E, Patrapuvich R, Weiss E, Brittnacher M & Manoil C (2013) Sequence-defined transposon mutant library of *Burkholderia thailandensis*. *MBio* 4(6):e00604-00613.
- Garcia-Ochoa F & Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances* 27(2):153-176.
- Gautam K & Tyagi V (2006) Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science* 55(4):155-166.
- Giani C, Wullbrandt D, Rothert R & Meiwes J (1996) *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. (Google Patents).
- Goecks J, Nekutenko A & Taylor J (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome biology* 11(8):R86.
- Gokulan K, Khare S & Cerniglia C (2014) METABOLIC PATHWAYS| Production of Secondary Metabolites of Bacteria. *Encyclopedia of Food Microbiology* 2:561–569.
- Goo E, Majerczyk CD, An JH, Chandler JR, Seo Y-S, Ham H, Lim JY, Kim H, Lee B & Jang MS (2012) Bacterial quorum sensing, cooperativity, and anticipation of stationary-phase stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(48):19775-19780.
- Gruszecki WI & Strzałka K (2005) Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1740(2):108-115.
- Gudiña EJ, Rodrigues AI, de Freitas V, Azevedo Z, Teixeira JA & Rodrigues LR (2016) Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresour. Technol.* 212:144-150.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1984a) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2):301-305.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1984b) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and environmental microbiology* 48(2):301-305.
- Guerra-Santos LH, Käppeli O & Fiechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24(6):443-448.
- Gunther NW, Nunez A, Fett W & Solaiman DK (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and environmental microbiology* 71(5):2288-2293.

- Gutiérrez-Gómez U, Servín-González L & Soberón-Chávez G (2019) Role of β -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology* 103(9):3753-3760.
- Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny M, Infante MR & Manresa A (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* 81(3):316-322.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1):249-273.
- Hauser G & Karnovsky ML (1957) Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 224(1):91-105.
- Hembach T (1994) *Untersuchungen zur mikrobiellen Umsetzung von Maiskeimöl zu Rhamnolipid.* (Universität Hohenheim).
- Henkel M, Müller MM, Kügler JH, Lovaglio RB, Contiero J, Syltatk C & Hausmann R (2012) Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry* 47(8):1207-1219.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36(4):478.
- Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Cámara M, Williams P & Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 186(10):2936-2945.
- Hingley ST, Hastie A, Kueppers F, Higgins M, Weinbaum G & Shryock T (1986) Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect. Immun.* 51(1):254-262.
- Ho BT, Dong TG & Mekalanos JJ (2014) A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe* 15(1):9-21.
- Hoffmann N & Rehm BH (2004) Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237(1):1-7.
- Hoffmann N, Steinbüchel A & Rehm B (2000) Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Applied microbiology and biotechnology* 54(5):665-670.
- Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, Pitt T, Churcher C, Mungall K & Bentley SD (2004) Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(39):14240-14245.
- Horiyama T & Nishino K (2014) AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. *PLoS One* 9(9):e108642.
- Hörmann B, Müller MM, Syltatk C & Hausmann R (2010) Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European journal of lipid science and technology* 112(6):674-680.
- Huang H, Zhou P & Xie J (2012) Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor lclR family. *Cellular signalling* 24(6):1270-1275.
- Humery A (2013) *La régulation de la production des rhamnolipides chez Burkholderia thailandensis.* (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Irfan-Maqsood M & Seddiq-Shams M (2014) Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Industrial biotechnology* 10(4):285-291.
- Irorere U V, Kwienien M, Tripathi L, Cobice D, McClean S, Marchant R & Banat IM (2019) Quorum sensing as a potential target for increased production of rhamnolipid biosurfactant in *Burkholderia thailandensis* E264. *Applied Microbiology and Biotechnology*:1-13.

- Irorere VU, Smyth TJ, Cobice D, McClean S, Marchant R & Banat IM (2018) Fatty acid synthesis pathway provides lipid precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Burkholderia thailandensis* E264. *Applied microbiology and biotechnology* 102(14):6163-6174.
- Irorere VU, Tripathi L, Marchant R, McClean S & Banat IM (2017) Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied microbiology and biotechnology* 101(10):3941-3951.
- Itoh S, HONDA H, TOMITA F & SUZUKI T (1971) Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *The Journal of antibiotics* 24(12):855-859.
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C & Levy R (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24):14339-14344.
- Jarvis F & Johnson M (1949) A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71(12):4124-4126.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH & Quax WJ (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76(1):46-65.
- Kamatkar NG & Shrout JD (2011) Surface hardness impairment of quorum sensing and swarming for *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* 6(6):e20888.
- Kapitein N & Mogk A (2013) Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Curr. Opin. Microbiol.* 16(1):52-58.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):634.
- Kessler B & Witholt B (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* 86(2):97-104.
- Kharazmi A, Bibi Z, Nielsen H, Hoibi N & Doring G (1989) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. *Apmis* 97(7-12):1068-1072.
- Kim J, Kang Y, Choi O, Jeong Y, Jeong JE, Lim JY, Kim M, Moon JS, Suga H & Hwang I (2007) Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular microbiology* 64(1):165-179.
- Kim J, Kim JG, Kang Y, Jang JY, Jog GJ, Lim JY, Kim S, Suga H, Nagamatsu T & Hwang I (2004) Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular microbiology* 54(4):921-934.
- Kiran GS, Ninawe AS, Lipton AN, Pandian V & Selvin J (2016) Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(3):399-415.
- Klena J & Schnaitman C (1993) Function of the *rfb* gene cluster and the *rfe* gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Molecular microbiology* 9(2):393-402.
- Koch AL & Ehrenfeld E (1968) The size and shape of bacteria by light scattering measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 165(2):262-273.
- Köhler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C & Pechère J-C (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology* 182(21):5990-5996.
- Koller M, Atlić A, Dias M, Reiterer A & Braunegg G (2010a) Microbial PHA production from waste raw materials. *Plastics from bacteria*, Springer. p 85-119.
- Koller M, Salerno A, Dias M, Reiterer A & Braunegg G (2010b) Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 48(3):255-269.
- Kourmentza C, Costa J, Azevedo Z, Servin C, Grandfils C, De Freitas V & Reis M (2018) *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresour. Technol.* 247:829-837.

- Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, Tyka M, Baker D & Karplus K (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77(S9):114-122.
- Kucera D, Benesova P, Ladicky P, Pekar M, Sedlacek P & Obruca S (2017) Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzates of spruce sawdust: Comparison of hydrolyzates detoxification by application of overliming, active carbon, and lignite. *Bioengineering* 4(2):53.
- Kuchta K, Chi L, Fuchs H, Pötter M & Steinbüchel A (2007) Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Biomacromolecules* 8(2):657-662.
- Lai S, Tremblay J & Déziel E (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental microbiology* 11(1):126-136.
- Lamark T, Røkenes TP, McDougall J & Strøm AR (1996) The complex bet promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *Journal of Bacteriology* 178(6):1655-1662.
- Lamont JC & Scott D (1970) An eddy cell model of mass transfer into the surface of a turbulent liquid. *AICHE J.* 16(4):513-519.
- Landfald B & Strøm AR (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 165(3):849-855.
- Lang S, Katsiwela E & Wagner F (1989) Antimicrobial effects of biosurfactants. *Lipid/Fett* 91(9):363-366.
- Lang S & Wullbrandt D (1999) Rhamnose lipids–biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(1):22-32.
- Laskoski K, Santos AR, Bonatto AC, Pedrosa FO, Souza EM & Huergo LF (2016) In vitro characterization of the NAD⁺ synthetase NadE1 from *Herbaspirillum seropedicae*. *Archives of microbiology* 198(4):307-313.
- Laskowski RA, Moss DS & Thornton JM (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* 231(4):1049-1067.
- Le Guillouzer S (2018) *Étude de la régulation des systèmes de communication intercellulaire chez la bactérie Burkholderia thailandensis*
- Ph.D (INRS Institut Armand-Frappier Santé Biotechnologie). 422 p
- Le Guillouzer S, Groleau M-C & Déziel E (2017) The complex quorum sensing circuitry of *Burkholderia thailandensis* is both hierarchically and homeostatically organized. *mBio* 8(6):e01861-01817.
- Lee IY, Kim MK, Chang HN & Park YH (1995) Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131(1):35-39.
- Lee J & Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell* 6(1):26-41.
- Lee KM, Hwang S-H, Ha SD, Jang J-H, Lim D-J & Kong J-Y (2004) Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnology and Bioengineering* 9(4):267-273.
- Lee SY (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering* 49(1):1-14.
- Lee Y, Lee SY & Yang J-W (1999) Production of rhamnolipid biosurfactant by fed-batch culture of *Pseudomonas aeruginosa* using glucose as a sole carbon source. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63(5):946-947.
- Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC & Mekalanos JJ (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(11):4154-4159.

- Lemoigne M (1927) Etudes sur l'autolyse microbienne. Origine de l'acide β -oxybutyrique formé par autolyse. *Ann. Inst. Pasteur* 41:148-165.
- Lesic B & Carniel E (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of bacteriology* 187(10):3352-3358.
- Li Z, Yang J & Loh XJ (2016) Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* 8(4):e265.
- Lin SC (1996) Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66(2):109-120.
- Linek V, Kordač M, Fujasová M & Moucha T (2004) Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tanks interpreted through models of idealized eddy structure of turbulence in the bubble vicinity. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 43(12):1511-1517.
- Linek V, Moucha T & Kordač M (2005) Mechanism of mass transfer from bubbles in dispersions: part I. Danckwerts' plot method with sulphite solutions in the presence of viscosity and surface tension changing agents. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 44(3):353-361.
- Loeschcke A & Thies S (2015) *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied microbiology and biotechnology* 99(15):6197-6214.
- Long J, He X, Cui X, Zhang B & Song C (2018) Mutagenesis of PhaR, a Regulator Gene of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* Caused Pleiotropic Phenotype Changes. *Frontiers in microbiology* 9:3046.
- Lourith N & Kanlayavattanakul M (2009) Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int. J. Cosmetic Sci.* 31(4):255-261.
- Lovell S, Davis I, Arendall W, de Bakker P, Word J, Prisant M, Richardson J & Richardson D (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50, 437e450.
- Lüthy R, Bowie JU & Eisenberg D (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356(6364):83.
- Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microb. Infect.* 2(9):1051-1060.
- Maehara A, Taguchi S, Nishiyama T, Yamane T & Doi Y (2002) A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *Journal of bacteriology* 184(14):3992-4002.
- Maier RM & Soberon-Chavez G (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(5):625-633.
- Majerczyk C, Brittnacher M, Jacobs M, Armour CD, Radey M, Schneider E, Phattarasokul S, Bunt R & Greenberg EP (2014a) Global Analysis of the *Burkholderia thailandensis* quorum-sensing-controlled regulon. *Journal of bacteriology*:JB. 01405-01413.
- Majerczyk C, Brittnacher MJ, Jacobs MA, Armour CD, Radey MC, Bunt R, Hayden HS, Bydalek R & Greenberg EP (2014b) Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *Journal of bacteriology* 196(22):3862-3871.
- Majerczyk C, Schneider E & Greenberg EP (2016) Quorum sensing control of Type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *Elife* 5:e14712.
- Majerczyk CD, Greenberg EP & Chandler JR (2013) Quorum sensing in *Burkholderia*. *Regulation of Bacterial Virulence*, American Society of Microbiology. p 40-57.
- Mao D, Bushin LB, Moon K, Wu Y & Seyedsayamdost MR (2017) Discovery of scmR as a global regulator of secondary metabolism and virulence in *Burkholderia thailandensis* E264. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(14):E2920-E2928.

- Marasco EK & Schmidt-Dannert C (2008) Identification of bacterial carotenoid cleavage dioxygenase homologues that cleave the interphenyl α , β double bond of stilbene derivatives via a monooxygenase reaction. *ChemBioChem* 9(9):1450-1461.
- Marchant R, Funston S, Uzoigwe C, Rahman P & Banat IM (2014) Production of biosurfactants from nonpathogenic bacteria. in *Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*:73-82.
- Martina P, Leguizamon M, Prieto CI, Sousa SA, Montanaro P, Draghi WO, Stämmeler M, Bettioli M, de Carvalho CC & Palau J (2017) *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(1):14-20.
- Martinez-Toledo A, Rios-Leal E, Vázquez-Duhalt R, González-Chávez MdC, Esparza-García J & Rodríguez-Vázquez R (2006) Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environmental technology* 27(2):137-142.
- Martinez S & Déziel E (2019) Polyhydroxyalkanoate granule accumulation makes optical density measurement an unreliable method for bacterial growth assessment in *Burkholderia thailandensis*. *bioRxiv* doi.org/10.1101/682161.
- Matlock B, Beringer R, Ash D, Page A & Allen M (2011) Differences in bacterial optical density measurements between spectrophotometers. *Thermo Scientific Technical Note* 52236.
- Matsufuji M, Nakata K & Yoshimoto A (1997) High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnology letters* 19(12):1213-1215.
- Matsuyama T & Nakagawa Y (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *Journal of microbiological methods* 25(2):165-175.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D & Défago G (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88(7):678-684.
- McClure CD & Schiller NL (1996) Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Current microbiology* 33(2):109-117.
- Mezzina MP & Pettinari MJ (2016) Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(17):5060-5067.
- Miller J (1972) Assay of β -galactosidase In: *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Miller MB & Bassler BL (2001) *Quorum sensing* in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 55(1):165-199.
- Mishra NN, Liu GY, Yeaman MR, Nast CC, Proctor RA, McKinnell J & Bayer AS (2011) Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(2):526-531.
- Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, Segura A & Ramos JL (2006) Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS microbiology reviews* 30(2):157-186.
- Monod J (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. PhD (Université de Paris, Hermann, Paris). 210 p(Consulté le 1941)
- Morsi H, Yong KL & Jewell AP (2004) Evaluation of the Taguchi methods for the simultaneous assessment of the effects of multiple variables in the tumour microenvironment. *International Seminars in Surgical Oncology*. BioMed Central, p 7.
- Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, Sedlacek P, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P & Nebesarova J (2016) Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 363(10):fnw094.

- Müller F, Hönzke S, Luthardt W-O, Wong EL, Unbehauen M, Bauer J, Haag R, Hedtrich S, Rühl E & Rademann J (2017) Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 116:31-37.
- Müller M, Hörmann B, Syltatk C & Hausmann R (2010) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Applied microbiology and biotechnology* 87(1):167-174.
- Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, Syltatk C & Hausmann R (2012) Rhamnolipids—next generation surfactants? *J. Biotechnol.* 162(4):366-380.
- Mulligan CN & Gibbs BF (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(11):3016-3019.
- Mulligan CN & Gibbs BF (2004) Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B* 70(1):31-56.
- Murata Y, Maeda Y, Kuniyasu H, Yamaguchi T, Tanaka M, Shimozawa R, Wakita H & Tabata Y (1997) Effects of temperature and chain length on the properties of long chain polyoxyethylene dodecyl ethers in aqueous solution. *Formation and Dynamics of Self-Organized Structures in Surfactants and Polymer Solutions*, Springer. p 70-74.
- Murray TS & Kazmierczak BI (2006) FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188(19):6995-7004.
- Myers D (2005) *Surfactant science and technology*. John Wiley & Sons,
- Nakata K, Yoshimoto A & Yamada Y (1998) Correlation between autoinducers and rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924. *J. Ferment. Bioeng.* 86(6):608-610.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology* 104(1):313-322.
- Nelson K, Weinel C, Paulsen I, Dodson R, Hilbert H, Martins dos Santos V, Fouts D, Gill S, Pop M & Holmes M (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology* 4(12):799-808.
- Nickzad A & Déziel E (2016) Adaptive significance of quorum sensing-dependent regulation of rhamnolipids by integration of growth rate in *Burkholderia glumae*: a trade-off between survival and efficiency. *Frontiers in microbiology* 7:1215.
- Nickzad A, Guertin C & Déziel E (2018) Culture Medium Optimization for Production of Rhamnolipids by *Burkholderia glumae*. *Colloids and Interfaces* 2(4):49.
- Nickzad A, Lépine F & Déziel E (2015) Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One* 10(6):e0128509.
- Nielsen J (1998) Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioeng.* 58(2-3):125-132.
- Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM & Daugherty SC (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(39):14246-14251.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* 27(2-3):313-339.
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T & Yamaguchi A (2003) Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(9):3030-3033.
- Nitschke M & Costa S (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18(5):252-259.
- Nitschke M, Costa SG & Contiero J (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 21(6):1593-1600.

- Nock AM & Wargo MJ (2016) Choline catabolism in *Burkholderia thailandensis* is regulated by multiple glutamine amidotransferase 1-containing AraC family transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 198(18):2503-2514.
- Noh NAM, Salleh SM, Abdullah AA-A & Mohd AR (2012) Fed-batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 producing rhamnolipid in bioreactor through pulse feeding strategy. *Int Conf Biol Life Sci.* p 45.
- Ochsner UA, Hembach T & Fiechter A (1995) Production of rhamnolipid biosurfactants. *Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids*, Springer. p 89-118.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A & Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 176(7):2044-2054.
- Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R & Soberón-Chávez G (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179(1):85-90.
- Oshiki M, Satoh H & Mino T (2011) Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Science and Technology* 64(3):747-753.
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z & Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences* 12(1):633-654.
- Page WJ & Tenove CJ (1996) Quantitation of poly- β -hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with Nile blue A. *Biotechnol. Tech.* 10(4):215-220.
- Pamp SJ & Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189(6):2531-2539.
- Pandit NK & Strykowski JM (1989) Effect of pH and temperature on the solubility of a surface active carboxylic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 78(9):767-770.
- Papenfort K & Bassler BL (2016) Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 14(9):576.
- Passanha P, Kedia G, Dinsdale RM, Guwy AJ & Esteves SR (2014) The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 163:287-294.
- Peace GS (1993) *Taguchi methods: a hands-on approach*. Addison Wesley Publishing Company,
- Peano C, Chiaramonte F, Motta S, Pietrelli A, Jaillon S, Rossi E, Consolandi C, Champion OL, Michell SL & Freddi L (2014) Gene and protein expression in response to different growth temperatures and oxygen availability in *Burkholderia thailandensis*. *PLoS One* 9(3):e93009.
- Peeters C, Meier-Kolthoff JP, Verheyde B, De Brandt E, Cooper VS & Vandamme P (2016) Phylogenomic study of *Burkholderia* glathei-like organisms, proposal of 13 novel *Burkholderia* species and emended descriptions of *Burkholderia sordidicola*, *Burkholderia zhejiangensis*, and *Burkholderia grimmiae*. *Frontiers in microbiology* 7:877.
- Piljac A, Stipčević T, Piljac-Žegarac J & Piljac G (2008) Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamnolipid ointment. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 12(3):142-146.
- Poblete-Castro I, Escapa IF, Jäger C, Puchalka J, Lam CMC, Schomburg D, Prieto MA & dos Santos VAM (2012) The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single-and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach. *Microbial cell factories* 11(1):34.
- Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB & Lam JS (2000) Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146(11):2803-2814.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS & Soberón-Chávez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes

- rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular microbiology* 40(3):708-718.
- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R & Tobes R (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2):326-356.
- Rashid MH & Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(9):4885-4890.
- Rawte T & Mavinkurve S (2004) Factors influencing polyhydroxyalkanoate accumulation in marine bacteria.
- Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology* 8(8):578.
- Rehm BH & Steinbüchel A (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International journal of biological macromolecules* 25(1-3):3-19.
- Reiling H, Thanei-Wyss U, Guerra-Santos L, Hirt R, Käppeli O & Fiechter A (1986) Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5):985-989.
- Remmert M, Biegert A, Hauser A & Söding J (2012) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9(2):173.
- Ren Q, de Roo G, Ruth K, Witholt B, Zinn M & Thöny-Meyer L (2009) Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* 10(4):916-922.
- Řezanka T, Siristova L & Sigler K (2011) Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles* 15(6):697.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J & Oliveira R (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(4):609-618.
- Rosen MJ & Kunjappu JT (2012) *Surfactants and interfacial phenomena*. John Wiley & Sons,
- Ryan WJ, O'Leary ND, O'Mahony M & Dobson AD (2013) GacS-dependent regulation of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(6):1795-1802.
- Sachdev DP & Cameotra SS (2013) Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* 97(3):1005-1016.
- Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, Brueggemann EE, Hines HB, Chen D, Lipscomb L, Kim HS, Mrázek J & Nierman WC (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Molecular microbiology* 64(6):1466-1485.
- Schwarz S, West TE, Boyer F, Chiang W-C, Carl MA, Hood RD, Rohmer L, Tolker-Nielsen T, Skerrett SJ & Mougous JD (2010) *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS pathogens* 6(8):e1001068.
- Schweizer HP & Chuanchuen R (2001) Small broad-host-range lacZ operon fusion vector with low background activity. *BioTechniques* 31(6):1258-1262.
- Sekhon Randhawa KK & Rahman PK (2014) Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology* 5:454.
- Senior P & Dawes E (1971) Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* 125(1):55-66.
- Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MG & Reis MA (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology* 81(4):615-628.
- Seyedsayamdost MR, Chandler JR, Blodgett JA, Lima PS, Duerkop BA, Oinuma K-I, Greenberg EP & Clardy J (2010) Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic letters* 12(4):716-719.

- Sha R, Meng Q & Jiang L (2012) The addition of ethanol as defoamer in fermentation of rhamnolipids. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87(3):368-373.
- Shah K (2014) Optimization and production of Polyhydroxybutarate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. *Intern J Curr Microbiol App Sci* 3(5):377-387.
- Shalom G, Shaw JG & Thomas MS (2007) In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* 153(8):2689-2699.
- Shang L, Jiang M & Chang HN (2003) Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology letters* 25(17):1415-1419.
- Sharff A, Fanutti C, Shi J, Calladine C & Luisi B (2001) The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* 268(19):5011-5026.
- Si M, Wang Y, Zhang B, Zhao C, Kang Y, Bai H, Wei D, Zhu L, Zhang L & Dong TG (2017a) The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. *Cell reports* 20(4):949-959.
- Si M, Zhao C, Burkinshaw B, Zhang B, Wei D, Wang Y, Dong TG & Shen X (2017b) Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(11):E2233-E2242.
- Sierra G (1960) Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 26(1):189-192.
- Singh A, Van Hamme JD & Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology advances* 25(1):99-121.
- Singh P & Cameotra SS (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnology* 22(3):142-146.
- Smith DD, Nickzad A, Déziel E & Stavriniades J (2016) A novel glycolipid biosurfactant confers grazing resistance upon *Pantoea ananatis* BRT175 against the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Mosphere* 1(1):e00075-00015.
- Soberón-Chávez G (2010) *Biosurfactants: from genes to applications*. Springer Science & Business Media, Soberon-Chavez G, Aguirre-Ramírez M & Sanchez R (2005) The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(11-12):675.
- Soberón-Chávez G, Lépine F & Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology* 68(6):718-725.
- Solaiman DK & Ashby RD (2005) Rapid genetic characterization of poly (hydroxyalkanoate) synthase and its applications. *Biomacromolecules* 6(2):532-537.
- Song JH, Jeon CO, Choi MH, Yoon SC & Park W (2008) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. *J Microbiol Biotechnol* 18(18):1408-1415.
- Sotirova A, Spasova D, Galabova D, Karpenko E & Shulga A (2008) Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr. Microbiol.* 56(6):639-644.
- Spiewak HL, Shastri S, Zhang L, Schwager S, Eberl L, Vergunst AC & Thomas MS (2019) *Burkholderia cenocepacia* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *MicrobiologyOpen*:e774.
- Stanghellini ME & Miller RM (1997) Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Dis.* 81(1):4-12.
- Stevenson K, McVey AF, Clark IB, Swain PS & Pilizota T (2016) General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific reports* 6:38828.

- Stipcevic T, Piljac A & Piljac G (2006) Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns* 32(1):24-34.
- Sugihara G, Yamakawa K, Murata Y & Tanaka M (1982) Effects of pH, pNa, and temperature on micelle formation and solubilization of cholesterol in aqueous solutions of bile salts. *The Journal of Physical Chemistry* 86(14):2784-2788.
- Sui X, Kiser PD, Von Lintig J & Palczewski K (2013) Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Archives of biochemistry and biophysics* 539(2):203-213.
- Taguchi G (1976) *Experimental Designs*. Maruzen Publishing Company. , Tokyo
- Takeshita K, Tamaki H, Ohbayashi T, Meng X-Y, Sone T, Mitani Y, Peeters C, Kikuchi Y & Vandamme P (2018) *Burkholderia insecticola* sp. nov., a gut symbiotic bacterium of the bean bug *Riptortus pedestris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(7):2370-2374.
- Tan G-Y, Chen C-L, Li L, Ge L, Wang L, Razaad I, Li Y, Zhao L, Mo Y & Wang J-Y (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers* 6(3):706-754.
- Tavares LF, Silva PM, Junqueira M, Mariano DC, Nogueira FC, Domont GB, Freire DM & Neves BC (2013) Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Applied microbiology and biotechnology* 97(5):1909-1921.
- Tiso T, Thies S, Müller M, Tsvetanova L, Carraresi L, Bröring S, Jaeger K-E & Blank LM (2017) Rhamnolipids: production, performance, and application. *Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: production of fuels and chemicals*:587-622.
- Tremblay J, Richardson AP, Lépine F & Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9(10):2622-2630.
- Trummler K, Effenberger F & Syldatk C (2003) An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. *European journal of lipid science and technology* 105(10):563-571.
- Tseng BS, Majerczyk CD, da Silva DP, Chandler JR, Greenberg EP & Parsek MR (2016) Quorum sensing influences *Burkholderia thailandensis* biofilm development and matrix production. *Journal of bacteriology* 198(19):2643-2650.
- Tuleva BK, Ivanov GR & Christova NE (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57(3-4):356-360.
- Uchino K, Saito T, Gebauer B & Jendrossek D (2007) Isolated poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *Journal of bacteriology* 189(22):8250-8256.
- Ulrich RL, DeShazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC & Jeddelloh JA (2004a) Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 53(11):1053-1064.
- Ulrich RL, DeShazer D, Hines HB & Jeddelloh JA (2004b) Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun.* 72(11):6589-6596.
- Ulrich RL, Hines HB, Parthasarathy N & Jeddelloh JA (2004c) Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *Journal of Bacteriology* 186(13):4350-4360.
- Urtuvia V, Villegas P, González M & Seeger M (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International journal of biological macromolecules* 70:208-213.
- Van Delden C & Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infect. Dis.* 4(4):551.
- Van Ditmarsch D, Boyle KE, Sakhtah H, Oyler JE, Nadell CD, Déziel É, Dietrich LE & Xavier JB (2013) Convergent evolution of hyperswarming leads to impaired biofilm formation in pathogenic bacteria. *Cell reports* 4(4):697-708.
- van Kessel JC, Rutherford ST, Cong J-P, Quinodoz S, Healy J & Bassler BL (2015) Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* 197(1):73-80.

- Vanavil B, Perumalsamy M & Seshagiri Rao A (2014) Studies on the effects of bioprocess parameters and kinetics of rhamnolipid production by *P. aeruginosa* NITT 6L. *Chemical and biochemical engineering quarterly* 28(3):383-390.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J & Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16(10):496-506.
- Vial L, Lépine F, Milot S, Groleau M-C, Dekimpe V, Woods DE & Déziel E (2008) *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of bacteriology* 190(15):5339-5352.
- Villano M, Beccari M, Dionisi D, Lampis S, Miccheli A, Vallini G & Majone M (2010) Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry* 45(5):714-723.
- Walter V, Syltatk C, Hausmann R & Flickinger M (2010) Microbial production of rhamnolipid biosurfactants. *Encyclopedia of industrial biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C & Bordoli L (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research* 46(W1):W296-W303.
- Weber CF & King GM (2017) Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing *Paraburkholderia* and *Burkholderia*: *Paraburkholderia hiiakae* sp. nov., *Paraburkholderia metrosideri* sp. nov., *Paraburkholderia paradisi* sp. nov., *Paraburkholderia peleae* sp. nov., and *Burkholderia alpina* sp. nov. a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Frontiers in microbiology* 8:207.
- Wen Q, Chen Z, Tian T & Chen W (2010) Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences* 22(10):1602-1607.
- Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M & Lapouge K (2014) NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 virulence. *Environ. Microbiol.* 16(4):1053-1068.
- Whang L-M, Liu P-WG, Ma C-C & Cheng S-S (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151(1):155-163.
- Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A & Mayer F (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology* 177(9):2425-2435.
- Wigneswaran V, Nielsen KF, Sternberg C, Jensen PR, Folkesson A & Jelsbak L (2016) Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* 15(1):181.
- Williams P & Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(2):182-191.
- Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M & Hausmann R (2017) Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Applied microbiology and biotechnology* 101(7):2865-2878.
- Wittgens A, Santiago-Schuebel B, Henkel M, Tiso T, Blank LM, Hausmann R, Hofmann D, Wilhelm S, Jaeger K-E & Rosenau F (2018) Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*—a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Applied microbiology and biotechnology* 102(3):1229-1239.
- Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M & Wilhelm S (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* 10(1):80.

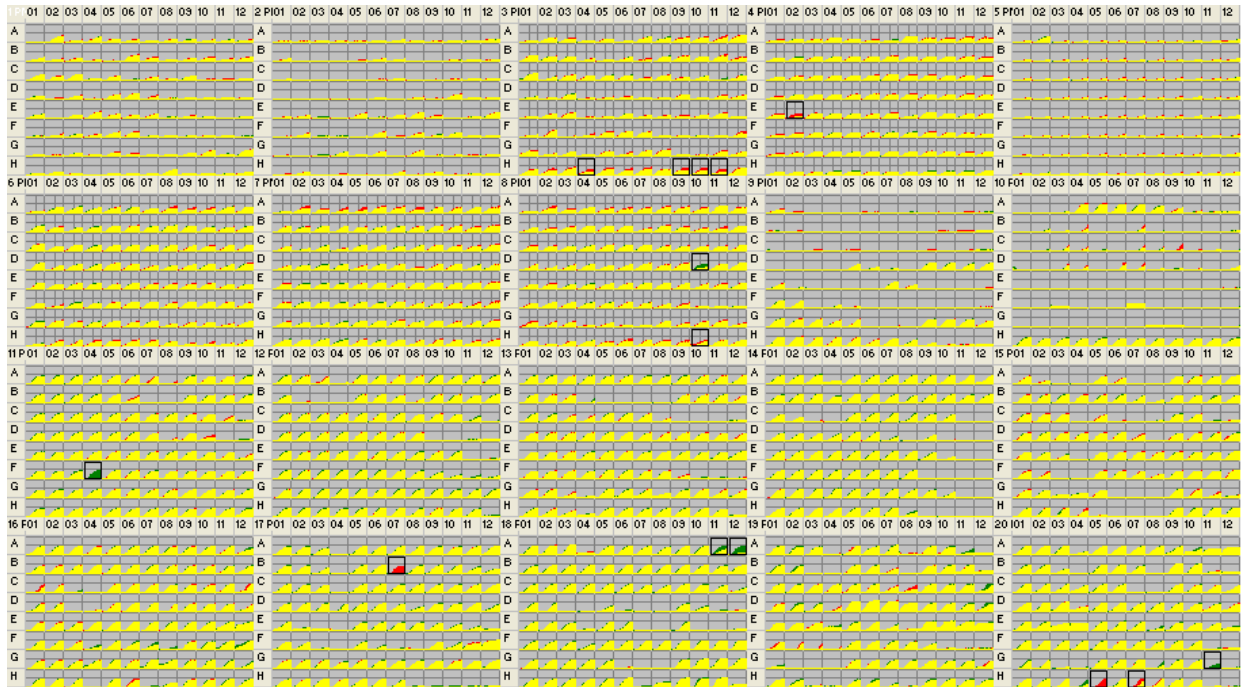
- Woodcock D, Crowther P, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith S, Michael M & Graham M (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research* 17(9):3469-3478.
- Wu J-Y, Yeh K-L, Lu W-B, Lin C-L & Chang J-S (2008) Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour. Technol.* 99(5):1157-1164.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36(12):1251-1275.
- Yang A, Tang WS, Si T & Tang JX (2017) Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical journal* 112(7):1462-1471.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J & Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12(1):7.
- York GM, Stubbe J & Sinskey AJ (2001) New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* 183(7):2394-2397.
- York GM, Stubbe J & Sinskey AJ (2002) The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *Journal of bacteriology* 184(1):59-66.
- Yu Y, Kim HS, Chua HH, Lin CH, Sim SH, Lin D, Derr A, Engels R, DeShazer D & Birren B (2006) Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. *BMC microbiology* 6(1):46.
- Zhang H-B, Wang L-H & Zhang L-H (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(7):4638-4643.
- Zhang L, Veres-Schalnat TA, Somogyi A, Pemberton JE & Maier RM (2012) Fatty acid cosubstrates provide β -oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(24):8611-8622.
- Zhao F, Shi R, Ma F, Han S & Zhang Y (2018) Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial cell factories* 17(1):39.
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH & Chen G-Q (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 276(1):34-41.
- Zhu K & Rock CO (2008) RhIA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 190(9):3147-3154.
- Zhu L, Yang X, Xue C, Chen Y, Qu L & Lu W (2012) Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. *Bioresour. Technol.* 117:208-213.
- Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix J-S & Meda P (2006) Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74(6):3134-3147.
- Zuriani R, Vigneswari S, Azizan M, Majid M & Amirul A (2013) A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering* 18(3):472-478.

11 ANNEXE I. DONNEES BIOLOG

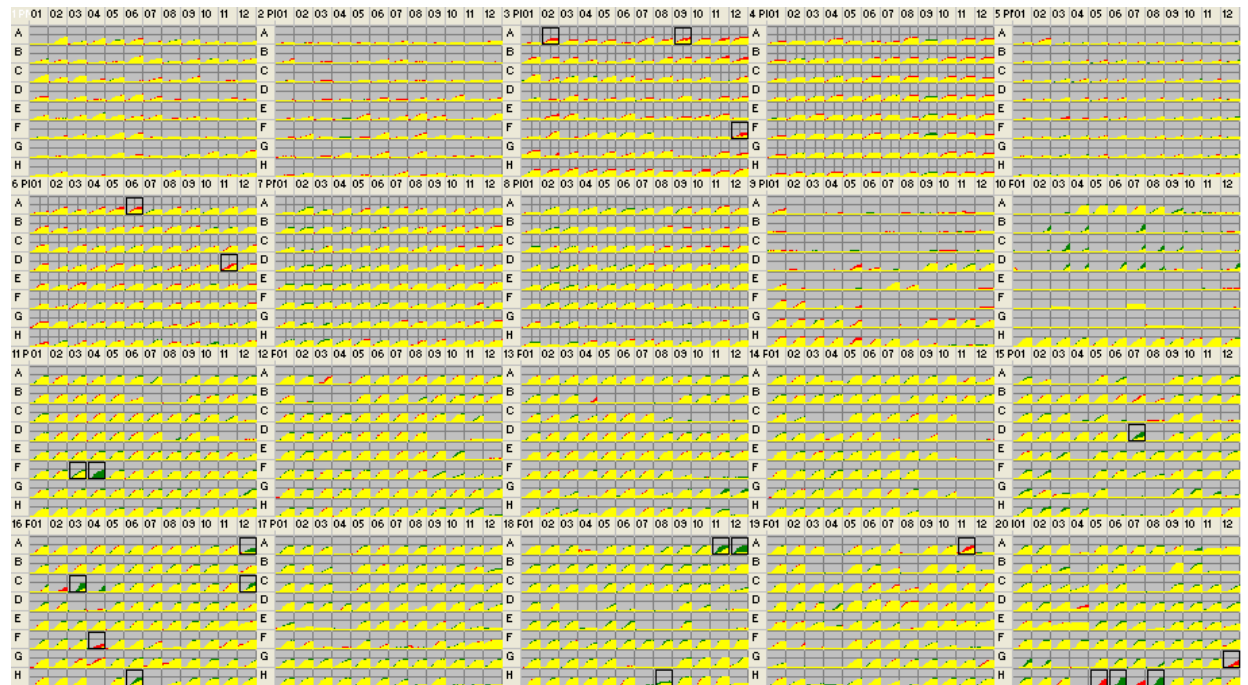
Des données BIOLOG étaient disponibles au sein du laboratoire pour la souche E264. Ces résultats ont été obtenus à 37°C. Ce système d'étude du métabolisme des micro-organismes repose sur l'utilisation de plaques 96 puits contenant 31 substrats de 6 classes différentes: amines, hydrates de carbones, sources de carbone complexes, acides carboxyliques, acides aminés et phosphates de carbone. Ces essais sur plaques sont répétés trois fois. Ainsi, on peut évaluer l'activité métabolique des micro-organismes cultivables ou non dans les différentes conditions testées. La consommation des différents substrats est révélée par un indicateur coloré dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie à 590nm, est proportionnelle à la consommation.

À la base, ces analyses avaient été réalisées pour comparer la souche E264 (en vert) avec un mutant *hmqA* (en rouge). Cependant les données n'ont pas montré de différences entre les deux souches en ce qui concerne les sources de carbone (plaques 1 et 2), d'azote (plaques 3,6,7,8) ou de phosphore (plaque 4).

Run 1:



Run 2:



Run 3 :



12 ANNEXE II. CALCUL DU NOMBRE DE MUTANTS ALEATOIRES A TESTER.

La puissance du crible dépend évidemment de la bonne couverture du génome, donc du nombre de clones testés. Le génome de *B. thailandensis* est composé de 5634 gènes codant des protéines et de 72 gènes codant des ARN. Le nombre de nucléotides présents au sein de cette bactérie est de 6723972.

Il est possible de réaliser une estimation basée sur les probabilités du nombre de transposants à tester. En effet, l'utilisation d'un petit programme permet d'effectuer une mutagenèse virtuelle en choisissant le nombre de clones. D'après des données de criblage ultérieurement mis en œuvre au sein du laboratoire sur *B. thailandensis*, l'estimation du nombre de clones à tester est de l'ordre de 70000 transposants. Dans le programme, réalisé sous R, le nombre de clones testés sera donc compris entre 0 et 80000 et attribué à la variable n. La fonction codée permet de donner n nombres entiers pris entre 1 et 5706, les numéros touchés par les n transpositions, en supposant que chaque transposition soit propre à un gène. Le programme sert à compter le nombre de gènes ayant été touchés au moins une fois et à déterminer le nombre de gènes ratés. Après modélisation on obtient les résultats suivants (**Tableau 12.1**).

Tableau 12.1 : Récapitulatif de la fréquence de gènes touchés et du nombre de gènes ratés selon le nombre de transposants considérés. Simulation de mutagenèse aléatoire réalisée pour *B. thailandensis*

Nombre de clones	0	5706	10000	20000	30000
Fréquence de gènes touchés	0	0,6209253	0.830745	0,973098	0,9926393
Nombre de gènes ratés	5704	2163	966	158	42
Nombre de clones	40000	500000	60000	70000	80000

Fréquence de gènes touchés	0,996495	1	1	1	1
Nombre de gènes ratés	20	0	0	0	0

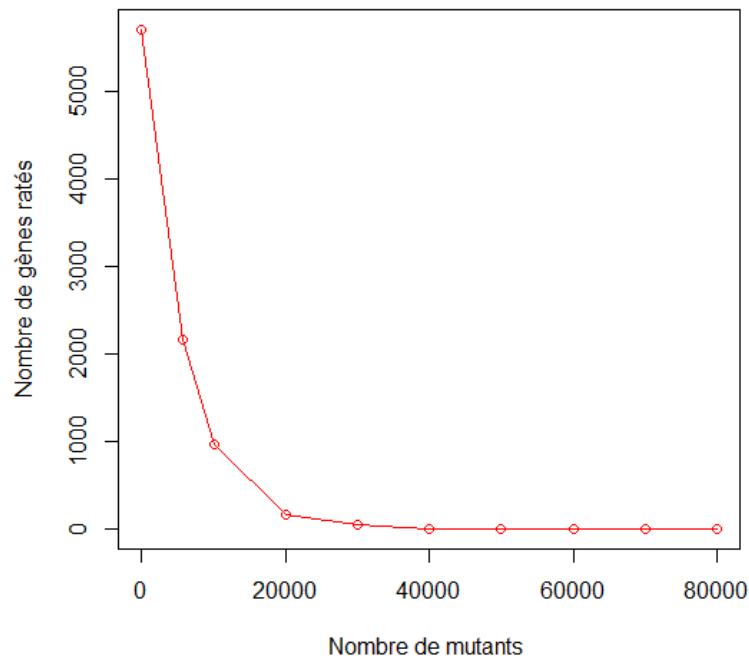


Figure 12.1 Courbe représentant le nombre de gènes n’ayant pas subi de transposition en fonction du nombre de mutants considérés.

On note qu’à partir de 50000 transposants testés le nombre de gènes non affectés par les mutations est nul.

Le nombre exact de transposants peut être calculé en se basant sur les probabilités. Si l’on considère G comme étant le nombre de gènes contenus dans le génome et N le nombre de clones obtenus, c’est-à-dire le nombre d’évènements de transposition indépendants ayant eu lieu dans le génome, chaque gène a une probabilité $p=1/G$ d’être touché par une transposition, qui peut aussi être traduite par la probabilité $q=1-p=(G-1)/G$ de ne pas être touché. Après N évènements de transposition indépendant, chaque gène aura la probabilité q^N de n’avoir jamais été touché :

$$qN = \left[\frac{G-1}{G} \right] \times N$$

Cette probabilité étant valable pour chaque gène et les gènes étant indépendants, on exprime R le nombre de gènes :

$$R = G \times qN$$

$$R = G \times \left[\frac{G-1}{G} \right]$$

Le nombre de gènes ratés suit une loi géométrique. En général, on souhaite $R < 1$, du moins en moyenne. La fonction $R(N)$ étant décroissante, on recherche N^* (le "bon" nombre de clones) tel que $R(N^*) = 1$, et si $N > N^*$ alors $R(N) < 1$.

$$R(N^*) = 1, \text{ soit } G \times \left[\frac{G-1}{G} \right] \times N^* = 1$$

D'où :

$$\ln(G) + N^* \cdot \ln \left[\frac{G-1}{G} \right] = 0$$

Soit :

$$N^* = \frac{\ln(G)}{\ln \left[\frac{G}{G-1} \right]}$$

A partir de cette relation, On peut calculer la valeur associée au nombre de clones nécessaires pour s'assurer de couvrir tout le génome, à savoir, pour 5706 gènes, 49348 transposants.

Cependant, il faut voir les limites de ces calculs, qui ne considèrent pas les gènes dits essentiels que l'on peut trouver dans la banque générée, ni les structures en opéron qui peuvent permettre à un seul transposon d'inactiver plusieurs gènes. De plus, dans ce cas, on considère que la probabilité de transposition est uniforme pour tous les gènes, ce qui sous-entend que l'on ne prend pas en compte leurs différences de taille. Cette estimation peut donc être discutée et réévaluée par différentes méthodes.

13 ANNEXE III. ARTICLE EN COLLABORATION

Structural determination of anatoside A: an unprecedented 15-membered macrolactone-containing glycolipid from *Pantoea ananatis*

Charles Gauthier^{a,†,*}, Serge Lavoie^{b,†}, Marianne Piochon^a, Sarah Martinez^a, Sylvain Milot^a, Eric Déziel^{a,*}

^aINRS – Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, boul. des Prairies, Laval (Québec), Canada, H7V 1B7

^bInstitut des Sciences de la Forêt Tempérée, Université du Québec en Outaouais, 58, rue Principale, Ripon (Québec), Canada, J0V 1V0

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. Tel.: +1 450-687-5010; E-mail addresses: charles.gauthier@iaf.inrs.ca (C. Gauthier); eric.deziel@iaf.inrs.ca (E. Déziel).

Publié dans Carbohydrate Research, Volume 471, January 2019, pages 13-18

Abstract

The bacterium *Pantoea ananatis* was reported to produce glycolipid biosurfactants of unknown structures. Herein, we present the isolation and structural determination of anatoside A, the main congener of a new family of 15-membered macrolactone-containing glycolipids. The structure of anatoside A was elucidated *via* chemical degradation and spectroscopic methods including 1D/2D NMR analysis, tandem MS/MS, GC-MS, HR-ESI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS, and polarimetry. Computational methods were used to predict the most abundant conformers of anatoside A.

Keywords: *Pantoea ananatis*, glycolipid, macrolactone, NMR analysis, biosurfactant

Surfactants of biological origin, *i.e.*, biosurfactants, are increasingly considered as substitutes for synthetic amphiphilic molecules in a wide variety of applications such as emulsifiers in soaps and detergents, oil spill remediation technologies, and in the food and beverage industry.¹ Microbially-derived biosurfactants are particularly attractive given the ease of large-scale sustainable production using renewable substrates for cultivation.² To satisfy the requirements for various physicochemical properties (e.g. heat and pH stability and/or activity, foaming, surface tension), an ever-present demand exists for the discovery of novel biosurfactants.

Rhamnolipids, a large family of mono- and dirhamnose-containing glycolipids fused to a dilipidic side chain made of 3-hydroxy fatty acids, are arguably the best-studied biosurfactants and are among the main bacteria-derived biosurfactants produced on a commercial scale.^{3,4} The production of rhamnolipids has been most extensively studied in the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*.⁵ The biosynthesis of rhamnolipids requires the successive function of three enzymes: RhlA, which directs the production of the lipidic precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs),^{6,7} as well as RhlB⁸ and RhlC,⁹ two rhamnosyltransferases.

Since *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen classified as a Level 2 biohazard, there are compelling reasons to identify alternative non-pathogenic producers.¹⁰ Interestingly, genome mining has revealed potential homologues/paralogues of *rhlA/rhlB/rhlC* in other bacterial species. For instance, several *Burkholderia* species encode these genes in operons and indeed produce rhamnolipids, although predominantly with a longer fatty acid side chain.¹¹⁻¹⁴ Recently, the bacterium *Pantoea ananatis* was also found to encode *rhlA* and *rhlB* homologues.¹⁵ Similar to *P. aeruginosa* and *Burkholderia*,¹⁶⁻¹⁸ loss of *rhlA* in *P. ananatis* BRT175 results in a defect in swarming motility, consistent with a lack of wetting agent production.¹⁵ Indeed, we found that BRT175 produces glycolipidic biosurfactants, which were surprisingly not rhamnolipids.¹⁵ While previous analyses revealed these glycolipids to contain typical rhamnolipid-like HAA moieties, the sugar portion, although not identified, was shown not to be a rhamnose.¹⁵ In this Research Note we present the isolation and structural elucidation of the main congener of this new family of biosurfactants, that we have named ananatosides.

P. ananatis was grown with shaking in liquid culture medium for seven days, sedimented, followed by EtOAc extraction of the supernatant. The glycolipid fraction was pre-purified by preparative normal phase TLC (EtOAc/MeOH), followed by semi-preparative reversed phase HPLC (H₂O/CH₃CN) to isolate pure ananatoside A (**1**) in the form of a yellow oil. Using tandem mass spectrometry, the structure of glycolipid **1** was tentatively identified as a hexose residue linked to two hydroxydecanoic acid chains (Figure 1).¹⁵

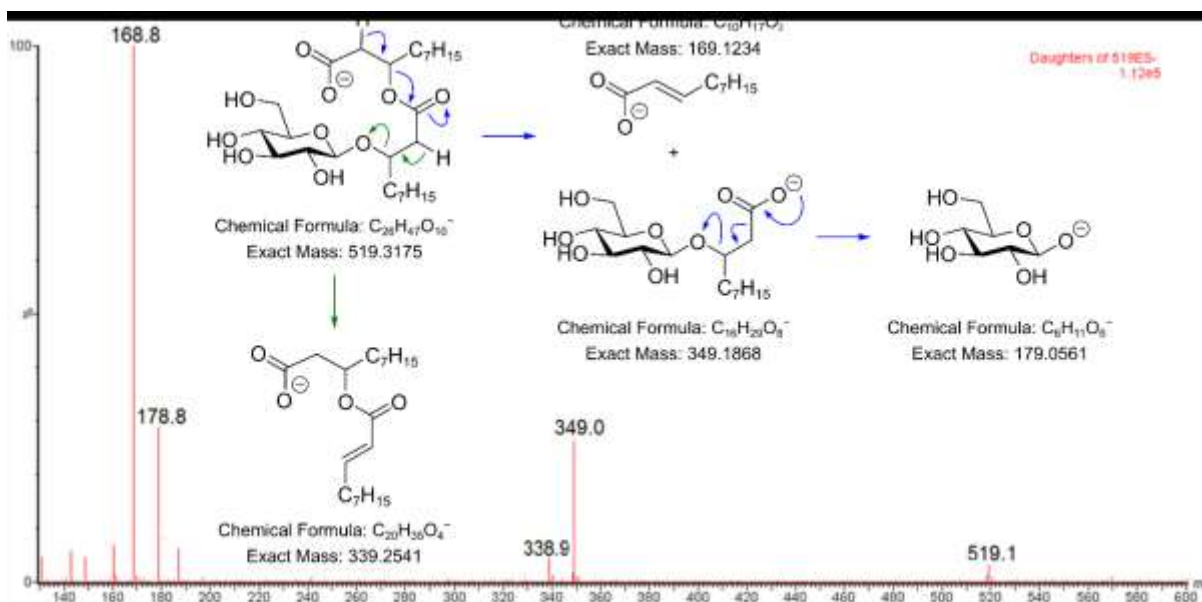


Figure 1. Low resolution tandem mass spectrum (MS/MS) of ananatoside A (**1**) obtained after fragmentation of the m/z 519 negative pseudomolecular ion produced in an electrospray ion source (ESI).

Ananatoside A (**1**) was then analysed by HR-ESI-TOF-MS in both positive and negative modes, yielding pseudomolecular ion peaks at m/z 543.3135 [$M + Na$]⁺ and m/z 519.3171 [$M - H$]⁻, respectively (see Figures S1–S2), thus confirming previous results.¹⁵ The nature of the hexose residue was difficult to determine by NMR due to peak overlaps and presence of hydroxylic hydrogens in DMSO-*d*₆. Interestingly, after trying different deuterated solvents, we found that the ¹H NMR spectra of glycolipid **1** in pyridine-*d*₅ showed no peak overlaps for the hexose residue (Figure 2). Careful examination of the ¹H and 2D ¹H-¹H COSY NMR spectra of glycolipid **1** in pyridine-*d*₅ allowed for the full assignment of all hexose protons (Table 1). A doublet at δ_H 5.11

(d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1) and large coupling constants (> 8.7 Hz) for all other hexose signals were observed on the *J*-resolved NMR spectrum (Figure 3) indicating the presence of a β -glucose residue. The alkyl chains were analysed using COSY and TOCSY NMR spectra. Starting from the oxymethines at δ_{H} 5.89 (H-3'') and 4.65 (H-3'), spin groups spanning from H₂-2'/H₂-2'' to H₂-7'/H₂-7'' were identified (Figure 4). The carbonyl groups were identified based on HMBC correlations of H₂-2'/H₂-2'' with δ_{C} 172.13 (C-1') and 170.41 (C-1''), respectively. The linkage between the glucose and the alkyl chains was determined from HMBC correlations from H-1 to C-3', and from H₂-6 to C-1'' (Figure 5). The latter correlation was unexpected given the previously proposed structure of glycolipid **1** (Figure 1). Furthermore, the chemical shifts of the free carboxylic acid (C-1') and the ester carbonyl (C-1'') were almost identical ($|\Delta\delta_{\text{C}}| = 1.7$). Also, a thorough examination of the NMR spectra recorded in acetone-*d*₆ highlighted a weak correlation between H-3'' and both C-1' and C-1'' (see Figure S13). This information suggested the presence of a macrolactone functionality in glycolipid **1** (Figure 4). We thus hypothesized that the acidic conditions used in the ESI source induced the hydrolysis of the lactone functionality to afford a glycolipid having free carboxylic acid and CH₂OH groups, as shown by the C₂₆H₄₈O₁₀ measured molecular structure. Anatoside A (**1**) was thus subjected to MALDI-TOF-MS using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. Accordingly, the MALDI analysis produced a pseudomolecular ion peak at m/z 525.2 [M + Na]⁺, supporting a C₂₆H₄₆O₉ molecular structure featuring a macrolactone ring (see Figure S3).

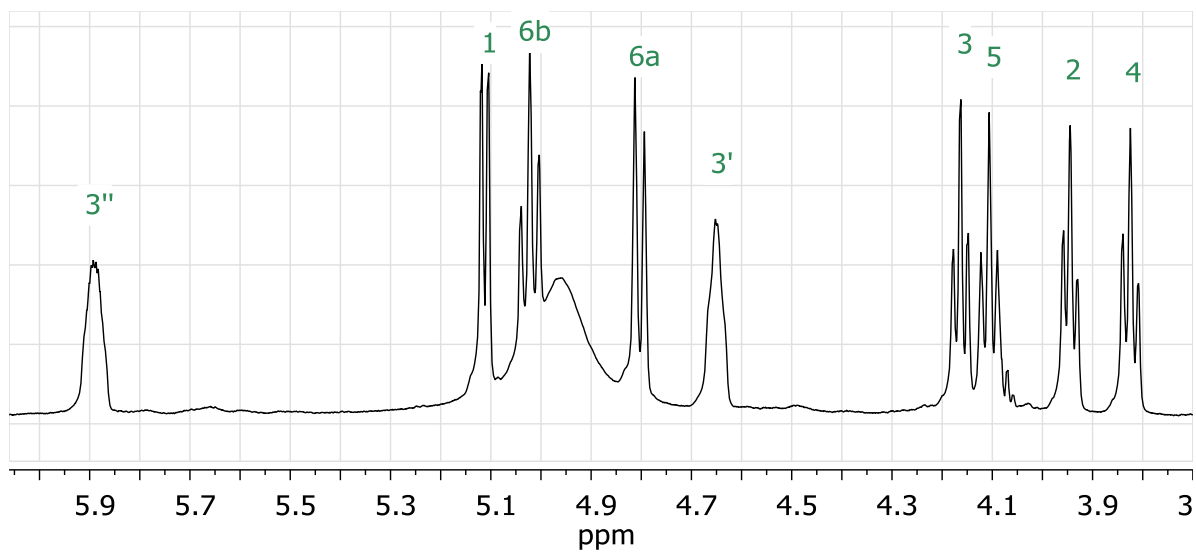


Figure 2. Selected region of the ^1H NMR spectrum of ananatoside A (**1**) in pyridine- d_5 at 600 MHz (see Fig. 4 for numbering).

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for ananatoside A (**1**)^a

Position	δ_C (mult.) ^b	δ_H (mult., int., J in Hz)
1	106.22 (d)	5.11 (d, 1H, 7.9)
2	75.61 (d)	3.95 (dd, 1H, 9.3, 7.9)
3	78.73 (d)	4.16 (dd, 1H, 9.3, 8.6)
4	72.79 (d)	3.83 (dd, 1H, 10.0, 8.6)
5	74.96 (d)	4.11 (td, 1H, 10.0, 2.1)
6	65.79 (t)	5.02 (dd, 1H, 11.6, 10.0) 4.80 (dd, 1H, 11.6, 2.1)
1'	172.13 (s)	–
2'	42.32 (t)	3.02 (dd, 1H, 18.2, 8.7) 2.72 (dd, 1H, 18.2, 1.1)
3'	78.43 (d)	4.65 (m, 1H)
4'	37.33 (t)	1.72 (m, 1H) 1.49 (m, 1H)
5'	26.25 (t)	1.60 (m, 1H)
6 ^c	30.10 (t)	1.17 (m, 2H)
7 ^c	29.86 (t)	1.13 (m, 2H)
8'	32.35 (t)	1.13 (m, 2H)
9'	23.22 (t)	1.18 (m, 2H)
10'	14.58 (q)	0.82 (t, 3H, 7.2)
1''	170.41 (s)	–
2''	41.43 (t)	2.86 (dd, 1H, 15.3, 2.9) 2.79 (dd, 1H, 15.3, 11.5)
3''	70.33 (d)	5.89 (m, 1H)
4''	35.60 (t)	1.60 (m, 1H) 1.53 (m, 1H)
5''	25.94 (t)	1.33 (m, 2H)
6'' ^d	29.97 (t)	1.23 (m, 2H)
7'' ^d	29.72 (t)	1.19 (m, 2H)
8''	32.31 (t)	1.18 (m, 2H)
9''	23.22 (t)	1.23 (m, 2H)

10"	14.58 (q)	0.85 (t, 3H, 7.1)
-----	-----------	-------------------

^a NMR spectra obtained at 600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C;

^b Multiplicity deduced from edited HSQC;

^{c,d} Assignment may be interchanged.

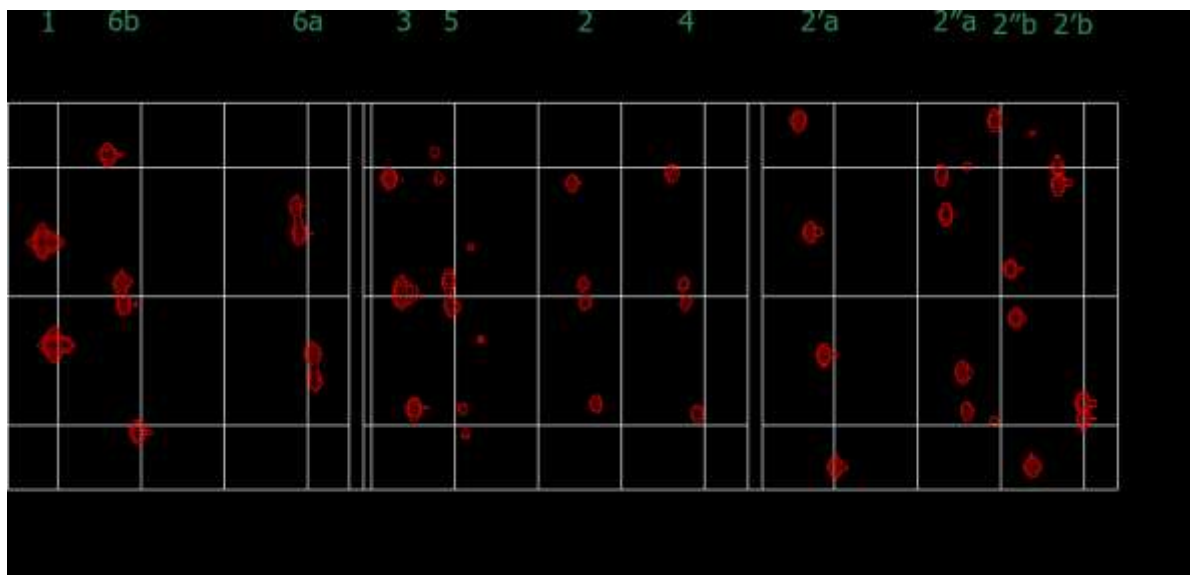


Figure 3. *J*-resolved NMR spectrum of the glucose moiety signals for anatoside A (1).

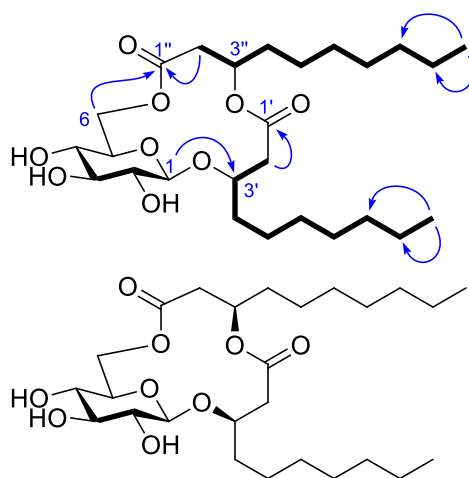


Figure 4. Proposed structure of anatoside A (1) along with key COSY (—) and HMBC (→) correlations.

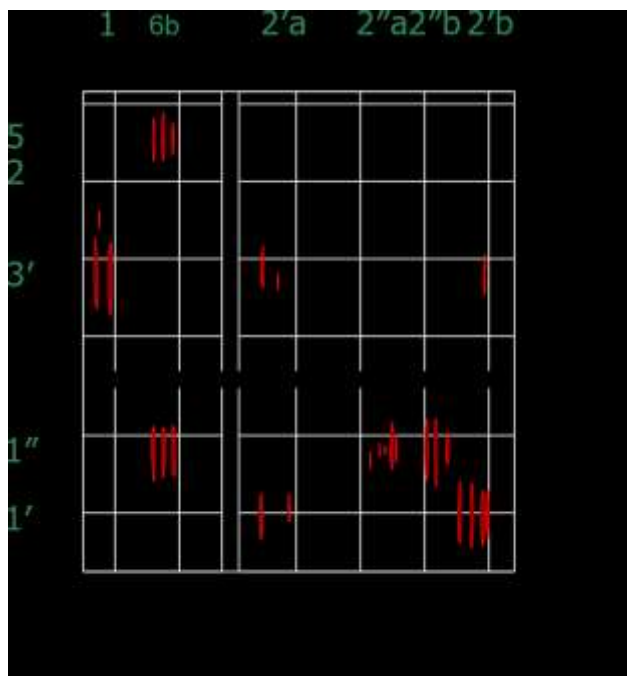


Figure 5. 2D HMBC NMR spectrum of anatoside A (**1**) in pyridine- d_5 showing bonding of the glucose moiety to the fatty acid chains.

In order to get insights into the absolute configuration of both the glucose and fatty acid chains, anatoside A (**1**) was subjected to acid hydrolysis under refluxing 1.0 N HCl in H₂O/EtOH conditions.¹⁹ HPLC-MS analysis was used to follow the completion of the reaction. After 1 h, the mixture contained free 3-hydroxydecanoic acid together with its dimer in a ~1:1 ratio. Prolonged hydrolysis time (two additional hours) was needed to quantitatively cleave the ester functionality between both fatty acid chains. Following neutralization to pH ~4, the lipid moiety was extracted from the aqueous phase with CHCl₃. The absolute configuration of 3-hydroxydecanoic acid was determined to be *R* on the basis of its specific rotation by comparison with literature data ($[\alpha]_D^{20} = -12$ (*c* 0.2, CHCl₃), lit.²⁰ $[\alpha]_D^{20} = -10.7$ (*c* 1.0, CHCl₃)). The *R* configuration of anatoside A (**1**) fatty acid chains matched with the one found in naturally occurring bacterial rhamnolipids.²¹ The absolute configuration of the glucose residue was also determined by measuring the optical rotation and was found to be D-(+)-glucose. In addition, GC-MS analysis of the silylated water-soluble sugar fraction in comparison with an authentic sample confirmed the identification of glucose (see Fig. S14–S16). On the basis of the above chemical and spectroscopic evidences, the complete structure of anatoside A (**1**) was established (Figure 4).

The scalar coupling constants of glycolipid **1** in pyridine-*d*₅ were extracted from the *J*-resolved NMR spectrum for almost all protons involved in the macrolactone ring (Table 2). To generate a useful dataset for subsequent studies, we next set out to build a precise *in silico* molecular model of the structure. A simplified model in which the C₇H₁₅ end groups were replaced by methyls was subjected to a conformational search using Spartan.⁷ As the coupling constants of the glucose protons were well-defined, we constrained their dihedral angles to minimize the conformational space to be explored. This procedure provided only five conformers within a relative energy window of 21 kJ·mol⁻¹. The geometries were further optimized in Gaussian²² using DFT at a mPW1PW91/6-311+G(2d,2p) level of theory. Computation of vibrational frequencies and thermochemical parameters were carried out to ensure that no imaginary frequency was present. The NMR spectroscopic data of the two predominant conformers, accounting for 99 % of the population, were predicted using gauge-independent atomic orbitals (GIAO) method and two-step spin-spin coupling constant calculations.²³ The results were weight-averaged by the Boltzmann distribution and scaled against the experimental values (Tables 2 and 3). The calculated values were in very close agreement with the experimental values indicating that the model was reliable. The two conformers differed only by the orientation of the C-1'' carbonyl. This difference did not severely impact the coupling constants, helping to explain the sharp signals detected in the ¹H NMR spectrum. Also, the proton H-3' was found 2.2 Å apart from the anomeric proton H-1, in both conformers, leading to strong NOESY correlations.

Table 2. Experimental and calculated coupling constant (J in Hz) for ananatoside A (**1**).

	Exp.	Calc. ^a	Δ
$J_{1,2}$	7.9	7.6	-0.3
$J_{2,3}$	9.3	9.0	-0.2
$J_{3,4}$	8.6	8.4	-0.2
$J_{4,5}$	10.0	9.4	-0.5
$J_{5,6a}$	2.1	2.6	0.5
$J_{5,6b}$	10.0	9.8	-0.2
$J_{6a,6b}$	-11.6	-11.9	-0.3
$J_{2'a,2'b}$	-18.2	-17.9	0.3
$J_{2'a,3'}$	8.7	8.8	0.1
$J_{2'b,3'}$	1.1	1.2	0.1
$J_{2''a,2''b}$	-15.3	-15.7	-0.4
$J_{2''a,3''}$	11.5	11.9	0.3
$J_{2''b,3''}$	2.9	3.6	0.7
		rmsd ^b	0.4
		MAE ^b	0.7

^a Values calculated at the mPW1PW91/6-311+G(d,p)// mPW1PW91/6-311+G(d,p) level of theory performed with polarizable continuum model (PCM) using pyridine;

^b rmsd = root mean square deviation, MAE = maximum absolute error.

Table 3. Experimental and calculated NMR chemical shifts for ananatoside A (**1**).

Position	δ_C			δ_H		
	Exp.	Calc. ^a	Δ	Exp.	Calc. ^a	Δ
1	106.2	103.4	-2.8	5.11	4.75	-0.36
2	75.6	75.3	-0.3	3.95	3.56	-0.38
3	78.7	77.4	-1.3	4.16	3.99	-0.18
4	72.8	71.6	-1.2	3.83	3.80	-0.03
5	75.0	74.2	-0.8	4.11	4.03	-0.07
6a	65.8	65.7	-0.1	4.80	4.55	-0.26
6b	–	–	–	5.02	5.26	0.24
1'	172.1	173.4	1.3	–	–	–
2'a	42.3	45.0	2.7	3.02	2.97	-0.05
2'b	–	–	–	2.72	2.74	0.03
3'	78.4	76.4	-2.0	4.65	4.89	0.24
1''	170.4	172.3	1.8	–	–	–
2''a	41.4	45.2	3.7	2.79	2.99	0.21
2''b	–	–	–	2.86	3.09	0.23
3''	70.3	69.3	-1.0	5.89	6.28	0.39
		rmsd ^b	1.9		rmsd ^b	0.24
		MAE ^b	3.7		MAE ^b	0.39

^a Values calculated at the mPW1PW91/6-311+G(d,p)// mPW1PW91/6-311+G(d,p) level of theory performed with polarizable continuum model (PCM) using pyridine;

^b rmsd = root mean square deviation, MAE = maximum absolute error.

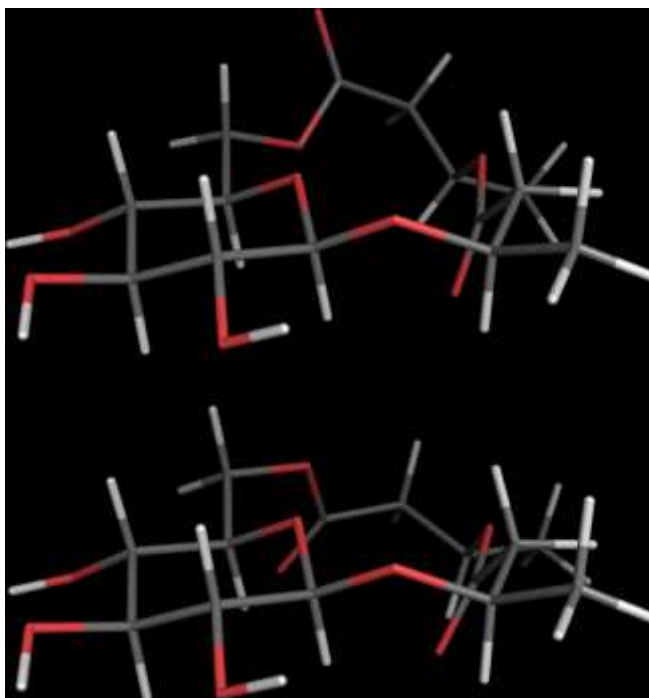


Figure 6. Most stable conformers of ananatoside A (**1**).

To our knowledge, the isolation of naturally occurring glycolipids featuring a 15-membered macrodilactone ring is unprecedented. However, glycolipids containing di- and trilactones comprising different macrocycle sizes compared to ananatoside A (**1**) have been identified from plants and other microorganisms. These include dimers of 4-(glycosyloxy)benzoates, isolated from folk medicinal plants, as well as cycloviracins, fattiviracins, macroviracins, and arthrobacilin A, which have been isolated from the Gram-positive bacteria *Kibdelosporangium albatum*, *Streptomyces microflavus*, *Streptomyces* sp. BA-2836, and *Arthrobacter* sp. NR2967, respectively.²⁴ Some of these glycolipids exhibit potent antiviral activities against herpes simplex virus type I, varicella-zoster virus, influenza virus A and B, and human immunodeficiency virus type 1. Structurally, two or three sugar units are embedded in the macrocycle ring of these compounds in contrast with ananatoside A (**1**) which contains only one glucose residue. Due to their atypical structures and interesting biological properties, the total synthesis of macrolactone-containing glycolipids have been a persistent challenge for organic chemists.^{24,25} Within this framework, it is worth mentioning the synthesis of unnatural 15-membered macrodilactone-containing glycolipids recently described by Si and Peczu.²⁶ In view of its potential biological

activity, we believe that ananatoside A (**1**) could represent an interesting and readily accessible synthetic target for organic chemists.

In summary, we have isolated and structurally identified by chemical and spectroscopic analyses ananatoside A (**1**), a novel glycolipid from bacterial cultures of *P. ananatis*. This biosurfactant features an unprecedented and unexpected 15-membered macrolactone ring in which a β -D-glucose residue is embedded into the macrocycle. During the course of this research project, less abundant glycolipid congeners were detected by LC-MS in the wild-type extract of *P. ananatis*.¹⁵ Two peaks with m/z values of 547.5 and 575.5 point toward the presence of ananatoside congeners featuring two hydroxydodecanoic and hydroxytetradecanoic acid chains, respectively. Similar to ananatoside A (**1**), we hypothesize that these glycolipid congeners are also found in the form of macrolactones and that the opened forms $[M + H_3O]^+$ were detected under the LC-MS conditions. Work towards the isolation, identification, and evaluation of the biological activities of ananatoside A (**1**) and its possible congeners is currently in progress in our laboratory.

1. Experimental

1.1. Bacterial culture conditions

Pre-culture tubes of *Pantoea ananatis* BRT175 (3 mL) were grown at 30 °C in LB medium with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada). Under exponential growth phase, LB medium pre-culture flasks (100 mL each) were seeded with an initial $OD_{600} = 0.1$ and cultures were incubated overnight at 30 °C with shaking (150 rpm). Twelve 2 L flasks, each containing 500 mL Mineral Salts Medium (MSM), were inoculated at an initial $OD_{600} = 0.1$ and cultures were grown at 30 °C with shaking (150 rpm). The MSM contained (g/L): 0.9 Na_2HPO_4 , 0.7 KH_2PO_4 , 2.0 $NaNO_3$, 0.1 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and trace element solution (2 mL/L). The composition of trace element solution was (g/L): 2.0 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 0.6 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. Dextrose (20 g/L) was provided as a carbon source. Cultures were grown for seven days.

1.2. Isolation procedure for ananatoside A (1)

At the end of the cultivation period, culture supernatant was recovered by centrifugation and concentrated HCl was added in order to reach a final pH = 3. Pooled supernatants (6 L total) were then extracted twice with equal volumes of EtOAc. The organic fractions were then pooled and the solvents were evaporated under reduced pressure to yield a crude extract containing the biosurfactant product. The crude extract (0.4 g) was resuspended in EtOH (2 mL) and this solution was deposited on a preparative normal phase TLC plate. The solvent system was composed of MeOH/EtOAc (1:4, 200 mL) containing 1 % acetic acid. Following migration, glycolipids were visualized using the ceric dip test.²⁷ The silica band corresponding to the glycolipids area on the TLC plate was scraped and transferred to a flash chromatography column in order to eluate the glycolipids using MeOH/EtOAc (1:3, 100 mL) as the eluent. Fractions containing the glycolipids, as shown by TLC, were pooled and the solvents were evaporated under reduced pressure to yield a residue (47 mg). The latter (10 mg) was resuspended in MeOH/H₂O (1:1), which was used for semi-preparative HPLC purification. The fractionation was realized using a Gemini-NX C₁₈ reverse-phase column. The injection volume was 20 μ L and the flow was set to 4 mL/min. The sequence duration was 27 min using the following solvent gradient: 0 \rightarrow 15 min H₂O/CH₃CN (50:50), 15 \rightarrow 18 min H₂O/CH₃CN (10:90), 18 \rightarrow 24 min 100 % CH₃CN, 24 \rightarrow 27 min (H₂O/CH₃CN 50:50). The presence of glycolipids (using *m/z* 519.5 as the reference) was verified in each fraction following injection by HPLC-APCI-MS (Quattro Premier XE, Waters) in the negative ionization mode. Fractions containing the *m/z* 519.5 glycolipid were pooled and extracted twice with equal volumes of EtOAc. The solvents were evaporated under reduced pressure to give ananatoside A (1, 4.5 mg) as a light yellow oil. $[\alpha]_D^{20} +15$ (*c* 0.24, EtOAc); ¹H (600 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR data (see Table 1); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 543.3135 [M + Na + H₂O]⁺ (calcd for C₂₆H₄₈O₁₀Na, 543.3145), *m/z* 519.3171 [M – H + H₂O][–] (calcd for C₂₆H₄₇O₁₀, 519.3169); MALDI (TOF) *m/z* 525.2 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₆H₄₆O₉, 525.3).

1.3. NMR analysis

The 1D and 2D NMR spectra (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H gCOSY, TOCSY, gHSQC, gHMBC, NOESY, *J*-resolved, HSQC band selective) were recorded on a Bruker Avance III HD 600 spectrometer (600 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) equipped with a 5 mm double resonance broad band probe. Spectra were acquired in DMSO-*d*₆, acetone-*d*₆ or Py-*d*₅, and chemical shifts were reported in ppm (δ) relative to TMS.

1.4. HR-ESI-TOF-MS and MALDI-TOF-MS analysis

Accurate mass analysis (HRMS) was carried out on a TOF 6224 instrument coupled to a 1260 HPLC system both from Agilent technologies. The sample was analysed in loop injection at 0.5 mL/min. The eluents consisted of 0.1 % formic acid in water (eluent A) and methanol (eluent B) in a constant ratio of 1:1 for a total analysis time of 0.5 min. The dual electrospray sources was operated in positive or negative ion mode and mass spectra were acquired from *m/z* 100 to 3200. MassHunter was used for data processing and accurate masses were calculated on both the protonated as well as the Na adduct species. The MALDI spectra was obtained on a 4700 MALDI TOF/TOF instrument (Ab Sciex Llc.) in the positive ion reflectron mode. Ananatoside A (1 mg) was co-crystallized with a 10 mg/mL aqueous solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and air dried prior to MALDI-TOF-MS analysis.

1.5. Acidic hydrolysis of ananatoside A (1)

Ananatoside A (1, 2.0 mg) was dissolved in EtOH (400 μL). Following the addition of a 1 N HCl aqueous solution (600 μL), the mixture was refluxed for 3 h. Then, EtOH was evaporated under a nitrogen stream. The mixture was transferred into a separatory funnel containing H₂O (3 mL) and CHCl₃ (2 mL). The aqueous phase was neutralized with a 5 N NaOH aqueous solution until pH 3–5. The aqueous phase was extracted three times with CHCl₃ (1 mL), the organic fractions were combined, and the solvent evaporated under a nitrogen stream. Completion of the acidic hydrolysis was confirmed by HPLC-APCI-MS (Quattro Premier XE, Waters) in the negative ionization mode (> 95 % of monolipid). The hydrolysate was dissolved in CHCl₃ (1 mL) and the optical rotation

was measured on a Rudolph Autopol VI polarimeter using a 10 cm cell at approximately 20 °C. The aqueous phase was directly subjected to optical rotation measurements using the same instrument. Then, the aqueous phase was neutralized with aqueous Na₂CO₃ until pH ~7 and freeze-dried to give a white amorphous powder. The residue was dissolved in anhydrous pyridine (1 mL) and treated with chlorotrimethylsilane (13 μL, ~6.0 equiv) and hexamethyldisilazane (6.4 μL, ~2.0 equiv) at 0 °C. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature overnight. GC-MS analysis (30 m × 0.25 mm ZB-SemiVolatiles column: He, 1 mL/min; 100 °C, 5 min, 100–225 °C, Δ 30 °C/min, 225 °C, 3 min, 225–310 °C, Δ 40 °C/min, 310 °C, 1 min; Programmed Temperature Vaporising splitless injection) gave one peak, *t*_R 10.5 min, which coeluted with a standard of 1,2,3,4,6-penta-*O*-trimethylsilyl-β-D-glucopyranose synthesized from D-glucose using the previously mentioned conditions (see Fig. S14–S16).

1.6. Molecular modelling

Ananatoside A (**1**) was subjected to quantum-chemical calculation in order to further confirm the proposed structure. First, a simplified 3D model, in which the C₇H₁₅ groups were replaced by methyls, was generated on Spartan²⁸ and a conformer search was done using MMFF94 force field and Monte Carlo algorithm. The dihedral angles for the glucose moiety of the model were constrained. All conformers below a cutoff of 21 kJ mol⁻¹ in relative energy were then subjected to a geometrical optimization with the help of Gaussian D09 package. The density of functional theory (DFT) was used at the B3LYP/6-31G* level of theory, and the resulting geometries were refined at the mPW1PW91/6-311+G(2d,2p) level of theory. In both cases, the interaction with the solvent was taken into account with the polarizable continuum model (IEF-PCM, solvent was pyridine). The calculation of the frequencies was carried out in order to derive the thermochemical parameters and to confirm that true minima were obtained (zero imaginary frequency). The values of free energies were extracted to compute the Boltzmann distribution. The shielding tensors were predicted using gauge-independent atomic orbitals (GIAO) at the mPW1PW91/6-311+G(d,p) level of theory, and averaged using their respective Boltzmann weight. The chemical shifts were finally derived by scaling the shielding tensors against the experimental values. The spin-spin

coupling constants were predicted using the two-steps algorithm provided in Gaussian²³ and averaged using the Boltzmann weights.

Acknowledgements

This work was supported by Discovery grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under award numbers RGPIN-2016-04950 (to C. G.) and RGPIN-2015-03931 (to E. D.). C. G. holds a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) Research Scholars Junior 2 Career Award. E. D. holds the Canada Research Chair in sociomicrobiology. The chemical modelling was enabled by the use of computing resources provided by WestGrid and Compute Canada. We thank Dr Kenneth Chan, National Research Council Canada, for performing the MALDI analysis, and Dr Alexandre Arnold, Université du Québec à Montréal, for performing the 600 MHz NMR analysis. The authors thank Prof. Salim Timo Islam, INRS-Institut Armand-Frappier, for constructive comments regarding the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/>.

References

1. Mnif, I.; Ghribi, D. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4310.
2. Marchant, R.; Banat, I. M. *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 1597.
3. Abdel-Mawgoud, A. M.; Hausmann, R.; Lépine, F.; Müller, M. M.; Déziel, E. In *Biosurfactants: from genes to applications.*; 1st ed.; Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer: 2011; Vol. 20, p 13.

4. Müller, M. M.; Kügler, J. H.; Henkel, M.; Gerlitzki, M.; Hörmann, B.; Pohnlein, M.; Syldatk, C.; Hausmann, R. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 366.
5. Soberon-Chavez, G.; Lepine, F.; Deziel, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 718.
6. Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; Villemur, R. *Microbiology* **2003**, *149*, 2005.
7. Zhu, K.; Rock, C. O. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 3147.
8. Ochsner, U. A.; Fiechter, A.; Reiser, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19787.
9. Rahim, R.; Ochsner, U. A.; Olvera, C.; Graninger, M.; Messner, P.; Lam, J. S.; Soberon-Chávez, G. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 708.
10. Chong, H.; Li, Q. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 137.
11. Andrä, J.; Rademann, J.; Howe, J.; Koch, M. H.; Heine, H.; Zähringer, U.; Brandenburg, K. *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 301.
12. Costa, S. G.; Déziel, E.; Lépine, F. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *53*, 620.
13. Dubeau, D.; Deziel, E.; Woods, D. E.; Lepine, F. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 263.
14. Häussler, S.; Nimtz, M.; Domke, T.; Wray, V.; Steinmetz, I. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1588.
15. Smith, D. D. N.; Nickzad, A.; Déziel, E.; Stavrinides, J. *mSphere* **2016**, *1*, e00075.
16. Dubeau, D.; Déziel, E.; Woods, D. E.; Lépine, F. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 263.
17. Köhler, T.; Curty, L. K.; Barja, F.; Van Delden, C.; Pechère, J.-C. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5990.
18. Nickzad, A.; Lépine, F.; Déziel, E. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128509.
19. Leon, I.; Enriquez, R. G.; Nieto, D. A.; Alonso, D.; Reynolds, W. F.; Aranda, E.; Villa, J. J. *Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1141.
20. Nakahata, M.; Imaida, M.; Ozaki, H.; Harada, T.; Tai, A. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1982**, *55*, 2186.
21. Abdel-Mawgoud, A.; Lépine, F.; Déziel, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1323.
22. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.

V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Wallingford, CT, 2016.

23. Deng, W.; Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1028.
24. Xie, J.; Bogliotti, N. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7678.
25. Fürstner, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 943.
26. Si, D.; Pecuh, M. W. *Carbohydr. Res.* **2016**, *434*, 113.
27. Mechaly, A.; Belakhov, V.; Shoham, Y.; Baasov, T. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 111.
28. Wavefunction, Inc.: Irvine, CA.