

Identification et production du biosurfactant inconnu de *Burkholderia cenocepacia* K56-2

Par

Xavier Perron

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles M. Dozois
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Esmaeel Qassim
Résistance induite et bioprotection des
plantes
Université de Reims Champagne-
Ardenne

Directeur de recherche

Eric Déziel
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Dépôt final : 24 avril 2023

© Droits réservés de « Xavier Perron », Décembre 2021

Remerciements

Je vais tenter de faire ça court et simple sans trop m'éterniser comme à mon habitude. Tout d'abord, j'aimerais remercier le jury d'avoir lu et de corriger ce mémoire qui est loin d'être parfait, mais que j'espère aura été plaisant et agréable à lire ! Même s'ils ne peuvent pas lire ce mémoire, car il n'est pas écrit en anglais, il ne faut pas oublier de remercier le professeur Eshwar Mahenthiralingam (Université de Cardiff) pour sa recette du milieu BSM qui a permis d'avoir une expression de l'opéron RhlABC autant en phase stationnaire qu'en phase exponentielle ainsi que Léo Eberl (Université de Zürich) pour son plasmide flippase pour lequel j'ai eu beaucoup de chance ! Le plasmide a été publié moins de 2 mois avant que je réalise que j'avais les mêmes problèmes que cet article et qu'il me fallait un plasmide spécifique à *B. cenocepacia* K56-2 pour exprimer la flippase ! Ensuite, j'aimerais remercier Marianne Piochon, l'ancienne chimiste du laboratoire, et Marie-Christine Groleau, notre agente de recherche, pour leur grande compréhension à mon égard ainsi que leur contribution au projet. Je dois aussi remercier les membres du laboratoire que j'ai croisé durant ma maîtrise, car l'effet de groupe m'a permis de rester motivé et de ne pas lâcher mon projet ni ma maîtrise qui aura tout de même duré presque 3 ans ! Finalement, je me dois de remercier mon directeur de recherche Eric Déziel sans qui rien de tout cela ne serait possible. Il m'a accepté dans son laboratoire malgré mes défauts et m'a gardé malgré mes hauts et mes bas. Cette équipe a été très compréhensive par rapport à la santé mentale (j'ai dû prendre une session d'arrêt) et mon retour ainsi que ma rédaction se sont faits à mon rythme et le projet progressait très bien malgré tout. Bref, merci à tout ce beau monde, je ne regrette rien de ma maîtrise et je referais les mêmes choix si c'était à refaire !

Résumé

La bactérie *Burkholderia cenocepacia* est un pathogène opportuniste appartenant au complexe *Burkholderia cepacia* (BCC). Le BCC est constitué d'un ensemble d'espèces apparentées, incluant plusieurs pathogènes pouvant coloniser les poumons des individus atteints de la fibrose kystique, que l'on retrouve dans les sols et qui possèdent une résistance intrinsèque envers plusieurs antibiotiques. Les rhamnolipides sont des métabolites extracellulaires amphiphiles (biosurfactant) produits pas des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia glumae* (pas un BCC), agissant comme agents mouillants qui abaisse la tension de surface et favorisent la motilité sociale de type *swarming*. Tout comme les bactéries connues pour produire des rhamnolipides, *B. cenocepacia* possède des homologues des gènes *rhIA/rhIB/rhIC*. Un mutant du gène *rhIA* de *B. cenocepacia* présente un défaut dans sa motilité de type *swarming*, suggérant fortement la capacité de produire un biosurfactant chez cette souche; cependant, malgré l'homologie des gènes, ceux-ci ne sont pas des rhamnolipides. Le laboratoire Déziel a déjà observé un phénomène correspondant puisque la bactérie *Pantoea ananatis* produit des glucolipides plutôt que des rhamnolipides, malgré la présence de gènes homologues. La nature de ce nouveau biosurfactant reste évasive. Afin d'identifier des conditions de culture favorisant sa production, une souche de *B. cenocepacia* avec le promoteur de l'opéron de synthèse *rhl* relié à un opéron *lux* a été créée, ce qui a permis d'optimiser les conditions d'expression et éventuellement de production. Grâce à cette optimisation, un milieu minimal a été développé qui révèle un défaut important de formation de biofilm chez le mutant *rhIA*- de *B. cenocepacia*, ainsi que des différences chromatographiques d'un extrait organique, en voie vers l'identification de ce nouveau biosurfactant.

Mots clés : *Burkholderia cenocepacia*; biosurfactant; rhamnolipides; métabolites; extraction; biofilm; *swarming*; clonage; fibrose kystique; luminescence

Abstract

The bacteria *Burkholderia cenocepacia* is an opportunistic pathogen belonging to the *Burkholderia cepacia* complex (BCC). The BCC group is made of closely related species, as well as species able to colonize the lungs of immunosuppressed people and cystic fibrosis patients, that are commonly present in soils and who possess a natural resistance to many antibiotics. Rhamnolipids are extracellular amphiphilic metabolites produced by bacteria, and most notably by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae* (not a BCC member), and act as wetting agents that lower surface tension and facilitate social motility called swarming. Just like other bacterial species known to produce biosurfactants, *B. cenocepacia* possesses ortholog genes for *rhlA/rhlB/rhlC*. A deletion mutant of the *rhlA* gene of *B. cenocepacia* presents a defect in its capability to swarm, strongly suggesting the capacity to produce a biosurfactant for this strain. However, despite similarities to the *rhl* genes, the molecules were not identified as rhamnolipids. The Deziel's laboratory already observed a similar phenomenon, since the bacteria *Pantoea ananatis* produces glucolipids instead of rhamnolipid even though it possesses *rhl* genes. The nature of this new biosurfactant is still elusive. In order to identify media favoring its production, a strain of *B. cenocepacia* with the promoter region of the *rhl* operon linked to a *lux* operon has been made, which made it possible to optimise the expression, then eventually the conditions of production. Thanks to this optimisation a minimal media was used for culture and demonstrated that an important lack of biofilm and differences in chemical composition in a *rhlA*- mutant of *B. cenocepacia* when compared to the wild-type parent strain. We are now beginning to investigate the structure of this new biosurfactant.

Keywords: *Burkholderia cenocepacia*; biosurfactant; rhamnolipids; metabolites; extraction; biofilm; swarming; cloning; cystic fibrosis; luminescence

Table des matières

Remerciements.....	ii
Résumé	iii
Abstract.....	iv
Liste des abréviations	iv
Chapitre 1: Introduction et revue de littérature.....	2
1.1 Structure du mémoire	2
1.2 Les surfactants d'origine microbienne (biosurfactants).....	3
1.2.1 Caractéristiques d'un biosurfactant	3
1.2.2 Les différents types de biosurfactants	4
1.2.3 Les rhamnolipides	7
1.2.4 Les gènes <i>rhIA rhIB</i> et <i>rhIC</i>	8
1.2.5 Régulation générale et utilité des rhamnolipides chez <i>P.aeruginosa</i> et <i>B.thailandensis</i>	11
1.2.6 Le cas particulier de <i>Pantoea ananatis</i>	11
1.3 Le genre <i>Burkholderia</i>	12
1.3.1 Le <i>Burkholderia cepacia complex</i> et <i>Burkholderia cenocepacia</i>	12
1.4 Le <i>Quorum Sensing</i>	13
1.5 La motilité de type <i>swarming</i>	15
1.6 Les biofilms.....	15
1.7 Méthodologie d'extraction des rhamnolipides	16
1.8 Méthodologies de détection des biosurfactants	16
1.9 Les travaux précédents ma maîtrise dans notre laboratoire.....	17
1.10 Hypothèse et objectifs du projet.....	18
Chapitre 2: Matériels et méthodes.....	19
2.1 Stratégie générale du projet.....	19
2.2 Souches et plasmides du projet.....	22
Les souches suivantes ont été utilisées durant le projet :	22
Les plasmides suivants ont été modifiés ou utilisés durant le projet (voir annexe 3 pour les cartes des plasmides) :	24
Les souches suivantes sont les souches que j'ai créées et/ou transformées durant ce projet :	25
2.3 Milieux de culture.....	26
Milieu Difco™ Tryptic soy broth (TSB).....	26
Milieu BD Difco Nutrient Borth (NB) + 0,5% dextrose	26

Milieu Lysogeny Broth (LB)	26
Milieu M9 dextrose	26
Milieu M9 Base pour variations	26
Milieu BSM Proline-Leucine	27
2.4 Courbes de croissance de différents mutants de <i>B.cenocepacia</i> K56-2.....	28
2.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour différents antibiotiques.....	28
2.6 Vaporisation à l'huile de géloses pour détection du biosurfactant	28
2.7 Essais de production du surfactant sur géloses sang	29
Géloses sang :	29
2.8 Essais de production du biosurfactant par <i>swarming</i> sur gélose.....	30
2.9 Extraction rapide de l'ADN génomique	30
2.10 Conditions de PCR optimales pour <i>B.cenocepacia</i> K56-2	31
Mélange de base pour amplification d'un fragment d'ADN de <i>B.cenocepacia</i> K56-2:.....	31
2.11 Purification des produits PCR et vérification sur gel.....	31
2.12 Extraction et purification des plasmides	32
2.13 Digestions enzymatiques des plasmides	32
2.14 Purifications sur gel des plasmides et produits PCR	32
2.15 Préparation de cellules compétentes d' <i>E.coli</i> et transformation par choc thermique	33
2.16 Construction du pEasy- <i>PrhIABC</i>	33
2.17 Construction du mini-CTX- <i>PrhIABC-lux</i>	34
2.18 Construction de la souche K56-2 ::CTX- <i>PrhIA-lux</i>	34
2.19 Modification du plasmide pBBR5::FLP-Tc ^R (Flippase)	34
2.20 Retrait de la cassette de résistance de Mini-CTX- <i>lux</i> par Flippase	35
2.21 Quantification de l'expression du rapporteur <i>PrhIA-lux</i>	36
2.22 Optimisation du milieu pour l'activité du rapporteur.....	36
2.23 Quantification de l'expression du rapporteur <i>PrhIA-lux</i> sur quelques milieux sélectionnés	42
2.24 Essai de production en milieu BSM Proline-Leucine	43
2.25 Extraction optimisée du biosurfactant en milieu BSM Proline-Leucine	43
2.26 Chromatographie sur couche mince des extractions (TLC).....	44
2.27 Essais de biofilms sur K56-2 et son mutant <i>rhIA-</i> dans différents milieux.....	45
Chapitre 3: Résultats.....	46
3.1 Courbes de croissance de différents mutants de <i>B. cenocepacia</i> K56-2.....	46
3.2 Détermination de concentrations minimales inhibitrices de différents antibiotiques envers <i>B. cenocepacia</i> K56-2 et quelques souches d' <i>E. coli</i>	48

3.3 Essais de production sur géloses sang.....	49
3.4 Essais de production du surfactant par croissance sur gélose permettant la motilité <i>swarming</i>	50
3.5 Cinétiques de luminescence avec construction propre	51
3.6 Sélection de différentes sources de carbones et d'azotes en base M9 pour optimisation du milieu de production du biosurfactant	54
3.7 Essais d'expression sur quelques milieux sélectionnés	56
3.8 Expression du biosurfactant et comparaison d'une base minérale M9 et BSM	58
3.9 Chromatographie sur couche mince des extractions et révélations (TLC).....	59
3.10 Essais de biofilms sur K56-2 et son mutant <i>rhlA</i> - dans différents milieux et observation du phénotype pellicule	61
Chapitre 4: Discussion	63
4.1 CMI et courbes de croissances des différents mutants de <i>B. cenocepacia</i> K56-2.....	63
4.2 Essais sur milieux sang et milieux <i>swarming</i>	64
4.3 Clonage de la région promotrice de <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2 et construction de la souche <i>B. cenocepacia</i> K56-2 ::CTX- <i>PrhlA-lux</i>	66
4.4 Cinétique de luminescence et sélection d'un milieu de culture optimisé	67
4.4.1 Sélection à partir d'une base M9	67
4.4.2 Sélection de la base BSM et choix final des conditions de production	68
4.5 Extraction chimique du biosurfactant et optimisation de la méthode	69
4.6 Essais de biofilms et observation du phénotype pellicule.....	70
4.7 Les travaux sur <i>Burkholderia lata</i> et comparaisons de son opéron <i>rhlABC</i>	71
4.8 Perspectives du projet	72
Chapitre 5: Conclusion.....	73
Bibliographie	74
Annexes.....	84
Annexe 1 : Informations importantes pour la reprise du projet	84
Annexe 2 : Amorces du projet (toutes commandées chez Alpha ADN, S.E.N.C).....	85
Annexes 3 : Cartes des plasmides utilisés.....	90

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique	L : Litre
WT : Wild Type	LB : Lysogeny Broth
AHL : N-acyl-homosérine lactone	M : Molaire
BDSF : Facteur signal diffusible du genre <i>Burkholderia</i>	mg : milligramme
BLAST : Basic local alignment search tool	mL : millilitre
BSM : Base Salt Medium	mM : millimolaire
°C : degrés Celsius	MS : Spectromètre de Masse
DAP : Acide diaminopimélique	M9 : Milieu minéral M9
DO600 : Densité optique à 600 nm	NB : Nutrient Broth
FLP : Flippase	pb : paire de bases
FRT : Région spécifique d'action de la flippase	PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
g : unité de force gravitationnelle	rpm : rotation par minute
g : gramme	RLU : Unités de lumière relative
Gen : gentamicine	Tc : tétracycline
h : heure(s)	Gen : gentamicine
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography. Possible de le relier à un appareil de MS	Tp : triméthoprim
Kan : kanamycine	^R : Suffixe indiquant la résistance à l'antibiotique qui le précède (Exemple : Tp ^R)
	V : Volts
	TSB : Tryptic Soy Broth

Chapitre 1: Introduction et revue de littérature

1.1 Structure du mémoire

Avant de se lancer dans la lecture de ce mémoire, voici deux petites sections concernant la structure de celui-ci ainsi que le contexte entourant le projet. Tout d'abord, il s'agit d'un mémoire classique sans article. La bibliographie se retrouve à la fin du mémoire juste avant les annexes. L'introduction débute par une revue de la littérature sur les biosurfactants en se concentrant sur les rhamnolipides, leur utilité en tant que facteur de virulence et le genre *Burkholderia* spp. Comme il n'existe presque aucune littérature sur l'existence d'un biosurfactant chez *B.cenocepacia* autre le fait que cette espèce possède un opéron *rhlABC*, la revue de littérature aura une structure un peu différente. J'ai d'abord commencé par une revue de littérature pour définir ce qu'est un biosurfactant et les différents types de biosurfactants qui existent pour montrer la diversité qui existe pour ce type de métabolite. J'ai ensuite mis en évidence les différents facteurs affectés par les biosurfactants ou les affectant. Enfin, je me suis concentré sur la méthodologie générale du projet ainsi que le genre *Burkholderia*. Puisque j'ai structuré ce mémoire autour de la méthodologie, j'ai cru bon de mettre la théorie derrière certaines méthodes (en particulier la détection des biosurfactants et le plasmide Mini-CTX-*lux*) dans l'introduction. Ensuite, la section matériels et méthodes a été écrite dans un ordre qui permet de comprendre l'histoire derrière le projet et non dans l'ordre que les manipulations aient été faites. Néanmoins, la majorité de la section matériel et méthode est déjà dans l'ordre chronologique du projet entre la section 2.8 à 2.30, les sections précédentes ont été faites en cours de chemin et aide à mieux comprendre l'ensemble du projet. Quant aux sections résultats et discussions, elles ont été écrites dans le même ordre qu'a été écrite la section matériels et méthodes pour garder la fluidité de la lecture. En finissant la section résultats, vous saurez exactement où a été laissé le projet lorsque je suis entré en rédaction de ce mémoire. De plus, dans les annexes, vous pourrez retrouver la carte des différents plasmides utilisés, les fiches originales des amorces ainsi qu'une page concernant les informations importantes pour la reprise du projet. Cette page pour la reprise du projet a été laissée pour l'étudiant(e) qui devra reprendre le projet pour qu'il ou elle soit au courant(e) des prochaines étapes. C'est une page un peu plus personnelle que j'aimerais qui soit laissée telle quelle après la correction par les membres du jury.

1.2 Les surfactants d'origine microbienne (biosurfactants)

Les biosurfactants sont des molécules produites par toutes sortes de microorganismes (d'où le préfixe bio) dont des bactéries, des levures et des moisissures (Roy, 2017). On les appelle surfactants parce que ce sont des molécules amphiphiles (qui contiennent une partie polaire et non polaire) leur permettant de s'accumuler aux interfaces et de former des micelles, ce qui abaisse la tension de surface de l'eau et permet la solubilisation dans l'eau de molécules hydrophobes (Adamczak et Bednarski, 2000) telles des liquides organiques (hexanes, huiles, chloroforme, acétate d'éthyle, etc.) dans l'eau (Banat, 1995; Karanth et al., 1999). Ces molécules ont une vaste gamme de propriétés et d'applications. Ils peuvent être utilisés comme agent émulsifiant, agent mouillant, agent moussant, agent d'étalement, ingrédient fonctionnel dans la nourriture et comme détergent (Vijayakumar et Saravanan, 2015). L'habilité des surfactants à réduire les tensions de surface les a rendus aussi importants pour récupérer des huiles et pour aider à la bioremédiation des déversements d'huiles pétrolières (Volkering et al., 1998).

1.2.1 Caractéristiques d'un biosurfactant

Les biosurfactants peuvent avoir plusieurs structures différentes. De manière générale, la portion hydrophobe est une longue chaîne d'acides gras, tandis que la portion hydrophile peut avoir une propriété ionique, non-ionique, amphiphile à l'aide d'acides aminés, d'un sucre ou de polysaccharides (Silva et al., 2014, Mao et al., 2015).

Parmi la variété de structures il y a les acides mycoliques des *Mycobacterium* spp, les glycolipides les polysaccharides lipidiques, les lipoprotéines, les phospholipides et parfois même la surface cellulaire du microorganisme en tant que tel (Sarah Horowitz et al. 1990). En plus de cette diversité de structures, il y a une diversité de production. Lorsque l'on veut produire un biosurfactant par un microorganisme, il faut prendre en compte la source de carbone, la source d'azote, la température, l'oxygène, l'agitation, etc. (Banat IM et al. 2010).

Les biosurfactants sont aussi divisés en deux grands groupes, soit les biosurfactants à haut poids moléculaire ou ceux à faible poids moléculaire (Rosenberg et Ron, 1999). Les biosurfactants à faible poids moléculaire (soit de 500 à 1500 Da) consistent en des phospholipides, les glycolipides, les lipides neutres, les acides gras, etc. (Banat IM et al. 2010) qui ont les propriétés suivantes : concentration micellaire critique faible (concentration micellaire critique, CMC), abaissement de la tension de surface et la tension interphase, stabilisation des émulsions, etc. (Batista et al., 2006, Uzoigwe et al., 2015). Du côté des hauts poids moléculaires, ce sont des molécules qui stabilisent les émulsions eau-huile sans abaisser la tension de surface (Gudiña et

al., 2015b) et sont composées de lipopolysaccharides, protéines, lipoprotéines ou glycoprotéines (Rosenberg et Ron, 1999, Uzoigwe et al., 2015).

1.2.2 Les différents types de biosurfactants

Depuis leur découverte et plus récemment grâce aux biotechnologies, il y a une recherche de nouveaux microorganismes capable de produire des biosurfactants avec un bon pouvoir émulsifiant ou actif sur les surfaces, en bref, on recherche de nouvelles sources de biosurfactants que ce soit sous forme de nouvelles structures ou de nouveaux microorganismes producteurs (Silva et al., 2014). La nature du biosurfactant dépend du microorganisme qui le produit et de la source environnementale de la souche d'intérêt que ce soit l'eau, le sol ou les environnements difficiles (Ibacache-Quiroga et al., 2013, Yan et al., 2014).

Le tableau 1.1 fournit un résumé (quoique non exhaustif) de microorganismes producteurs de biosurfactants.

Tableau 1.1 : Quelques biosurfactants et leurs microorganismes producteurs.

Microorganismes	Biosurfactant/bioémulsifiant
<i>Microbacterium</i> sp. MC3B-10	Microbactane
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Burkholderia</i> ¹ <i>thailandensis</i> E264	Rhamnolipides
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosine
<i>Bacillus subtilis</i> SPB ₁	Surfactine/Iturine
<i>Bacillus subtilis</i> JB1	Subtilisine
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PTCC 1316	Emulsane
<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Alasane
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Biodispersane
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Viscosine
<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettine
<i>Serratia rubidaea</i> SNAU02	Rhamnolipides

Microorganismes	Biosurfactant/bioémulsifiant
<i>Gordonia</i> sp. BS29	Bioémulsane extracellulaire
<i>Pedobacter</i> sp. MCC-Z	Complexe Glycolipide-Protéine
<i>Streptomyces</i> sp. MAB36	Glycolipide
<i>Rhodotorula babjevae</i> YS3	Sophorolipides
<i>Halomonas eurihalina</i>	Glycoprotéine
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Complexe carbohydre-lipide
<i>Paenibacillus</i> sp. #510	Complexe oligosaccharide-lipide
<i>Achromobacter</i> sp. HZ01	Lipopeptide
<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i> C1	Glycoprotéine
<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	Glycolipoprotéine
<i>Penicillium chrosogenum</i> SNP5	Lipopeptide
<i>Candida bombicola</i>	Sophorolipides
<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	Rufisane
<i>Candida sphaerica</i> UCP 0995	Lunasane
<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50,682	Yansane
<i>Ustilago maydis</i>	Lipides de cellobiose
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	Mannosylerythritol lipide
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> CLA2	Complexe lipopolysaccharide

¹ : cette souche est nommée *Bacillus thailendensis* E264 dans l'article de revue original, une erreur de taxonomie que j'ai jugé bon de corriger puisque nous possédons cette souche dans notre laboratoire. Tableau adapté d'Adetunji et Olaniran, janvier 2021.

Il existe deux manières de classer les biosurfactants. Il y a la méthode des poids moléculaires (Rosenberg et Ron, 1999) qui inclut la deuxième, soit la méthode par source microbologique et groupements fonctionnels (Banat et al., 2010, Vijayakumar et Saravanan, 2015). Le tableau 1.2 (adapté d'Adetunji, 2017), présente un résumé des classes majeures de biosurfactants et de quelques-uns des produits possibles pour chacune des classes selon la deuxième méthode. Dans le cadre de ce mémoire, la méthode par groupements chimiques sera utilisée parce qu'il est plus spécifique et naturel à utiliser puisqu'il sera surtout question de glycolipides.

Tableau 1.2. Classes majeures de biosurfactants microbiens

Classes	Exemples
Glycolipides	Rhamnolipides
	Sophorolipides
	Trehalolipides
Lipopeptides et lipoprotéines	Viscosine
	Serrawettine
	Polymyxine
	Gramicidine
	Subtilisine
	Surfactine
	Peptide-lipide
Acides gras, lipides neutres et phospholipides	Acides gras
	Lipides neutres
	Phospholipides
Surfactants polymériques	Emulsane
	Alasane

Classes	Exemples
	Biodispersane
	Lipomanane
	Liposane
	Lipide mannane-protéine
	Carbohydrate-lipide-protéine
	Protéine PA
Surfactants particuliers	Vésicules

Tableau adapté d'Adetunji, 2017

Ce mémoire s'intéresse principalement aux glycolipides, alors il n'y aura pas plus de détails sur les autres classes de biosurfactants. Pour plus d'information, on suggère au lecteur de consulter Adetunji et Olaniran (2021).

Les glycolipides sont des biosurfactants couramment étudiés et particulièrement communs. Ils consistent en un ou des sucre(s) relié(s) à des acides gras par des liaisons éthers ou esters (A.I. Adetunji, A.O. Olaniran, 2021) (voir section 1.2.3 pour un exemple avec les rhamnolipides). Le groupement sucre peut consister entre autre, en un mannose, dextrose, galactose sulfate ou un acide glucuronique (Desai and Banat, 1997). Néanmoins, les glycolipides les plus connus sont les rhamnolipides, les mannosylerythriol lipides, les trehaloses lipides, les cellobiolipides, et les sophorolipides (Chrzanowski et al., 2012). Dans le cadre de cette revue de littérature, il sera surtout question des rhamnolipides.

1.2.3 Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont une famille de biosurfactants produits notamment par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* et quelques espèces du genre *Burkholderia* (Abdel-Mawgoud et al. 2010). Ce glycolipide consiste en un rhamnose ou deux rhamnoses liés à un dimère d'acide β -hydroxyalcanoïque (Jarvis and Johnson, 1949, Chong and Li, 2017). Le groupe hydroxyle de l'un des acides est relié à un rhamnose via une liaison glycosidique à l'aide d'une estérification (Muthusamy et al., 2008). Dans la figure 1.1 est présenté l'exemple d'un rhamnolipide typique de *P.aeruginosa* (Abdel-Mawgoud et al. 2011). Cette molécule est amphiphile grâce à une portion aliphatique hydrophobe à longueur variable et sa tête hydrophile composée d'un ou deux

rhamnoses, ce qui en fait un glycolipide (Abdel-Mawgoud et al. 2011). Ces composés abaissent la tension de surface, mouillent les surfaces et possèdent une activité antimicrobienne (Haba et al. 2003; Benincasa et al. 2004; Diaz De Rienzo et al. 2016; Tedesco et al. 2016) et antifongiques (Sha et al. 2012; Sha and Meng 2016).

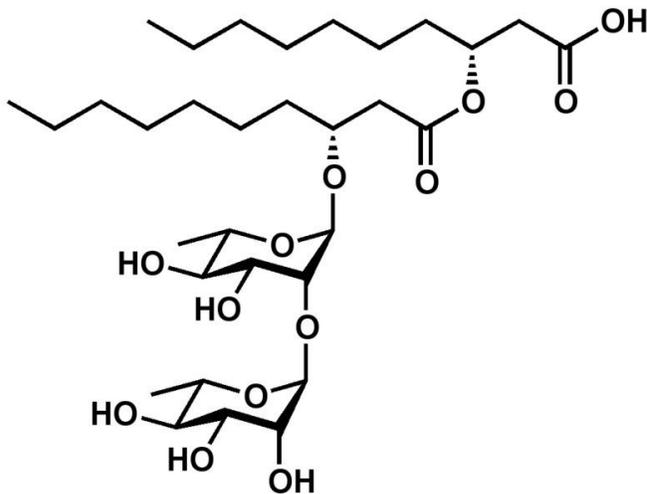


Figure 1.1 : Rhamnolipide majoritaire produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Di-Rhamnolipide)

Abdel-Mawgoud et al. 2011

1.2.4 Les gènes *rhlA* *rhlB* et *rhlC*

La biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* requiert les enzymes codées par l'opéron *rhlABC* (Soberon-Chavez et al. 2005).

La structure des gènes *rhlABC* est présentée à la figure 1.2. On peut y avoir la structure des gènes *rhlABC* de *Burkholderia glumae*, *P. aeruginosa* et *Burkholderia thailandensis*. Quoique non présentées dans cette figure, *Burkholderia mallei* et *Burkholderia pseudomallei* possèdent aussi la même structure d'opéron que *B. thailandensis*. Quant au sous-groupe des *Burkholderia cepacia* complex (BCC) la structure de l'opéron est différente et possède un gène supplémentaire tel que présenté dans la figure 1.3.

Ce qui est important à noter, est la présence d'un gène supplémentaire par rapport à *B. thailandensis*, possiblement un gène codant pour une méthyltransférase qui est aussi également bien conservée chez les BCC. Les gènes *rhlABC* régulent la rhamnosyltransférase I et II ainsi que la formation du lipide précurseur tel que présenté par la voie catabolique de la figure 1.4 (Bahia F et al. 2018). La phylogénie des opérons *rhlABC* est présentée dans la figure 1.5 (Germer et al. 2020). Il est important de savoir que *Dietzia maris* produit un rhamnolipide (Wang W. et al

2014), mais ce n'est pas le cas pour *B. cenocepacia*. Cela explique aussi le cas particulier de *Pantoea ananatis* qui produit un glucolipide (Section 1.2.6)

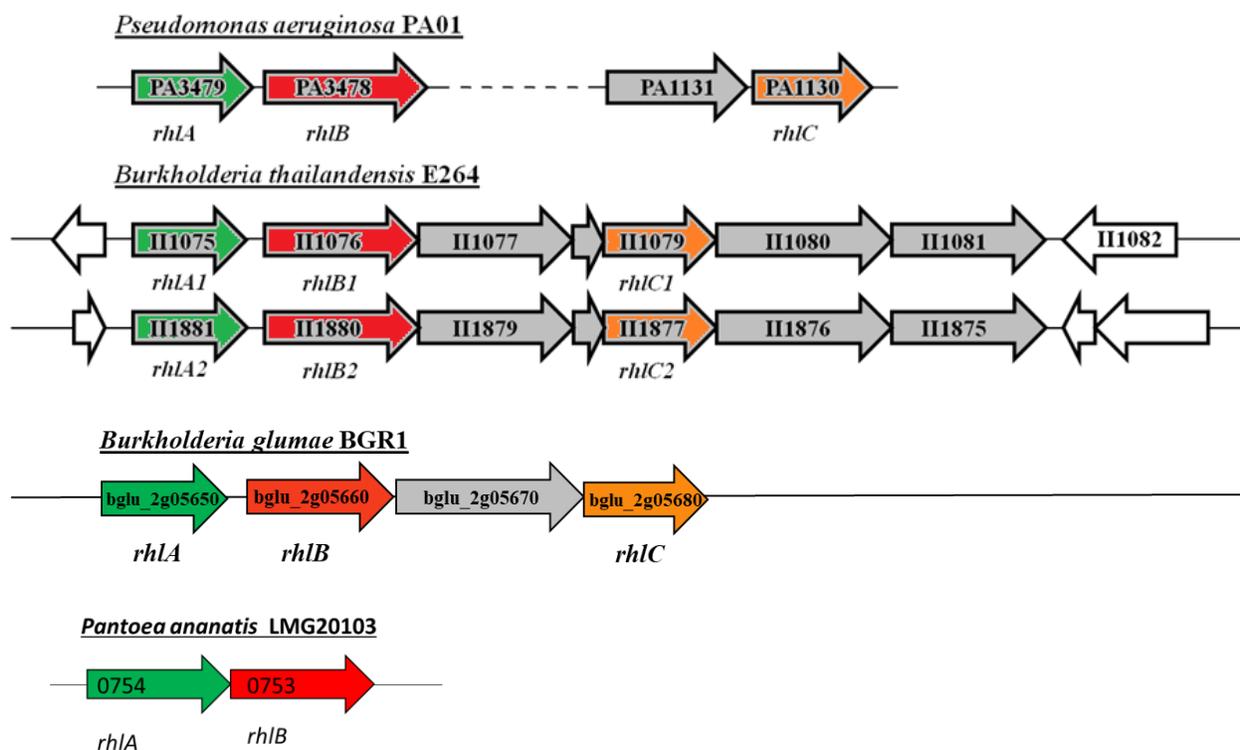


Figure 1.2 : Organisation des gènes *rhlA*, *rhlB*, *rhlC* chez *P. aeruginosa*, *B. thailandensis*, *B. glumae* et *P. ananatis*

Figure adaptée de Nickzad 2012; Dubeau et al. 2009

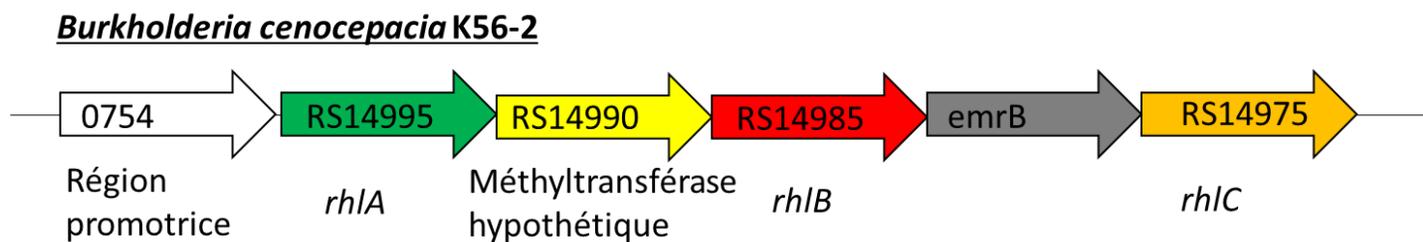


Figure 1.3 : Structure de l'opéron *rhlABC* de *Burkholderia cenocepacia* K56-2

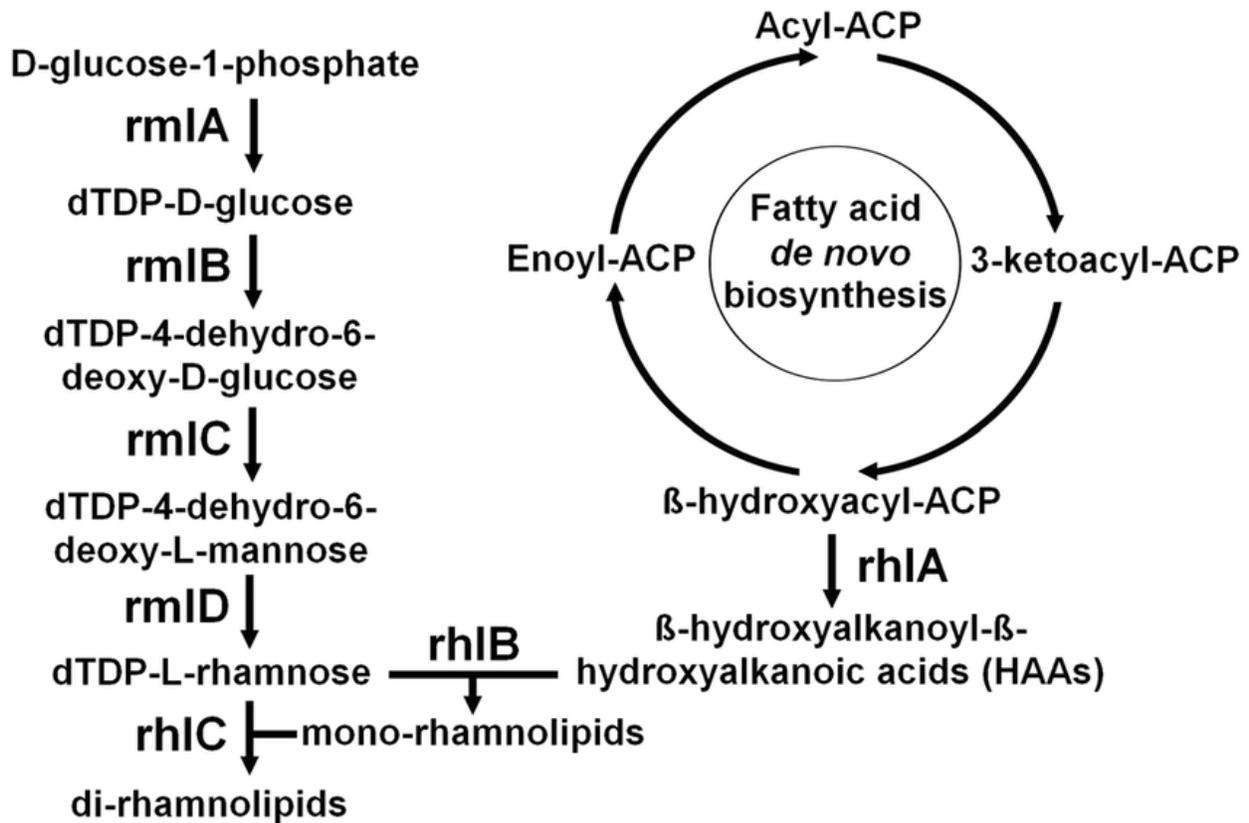


Figure 1.4 : Voie métabolique de la formation des rhamnolipides par l'opéron *rhlABC*

Bahia F et al. 2018

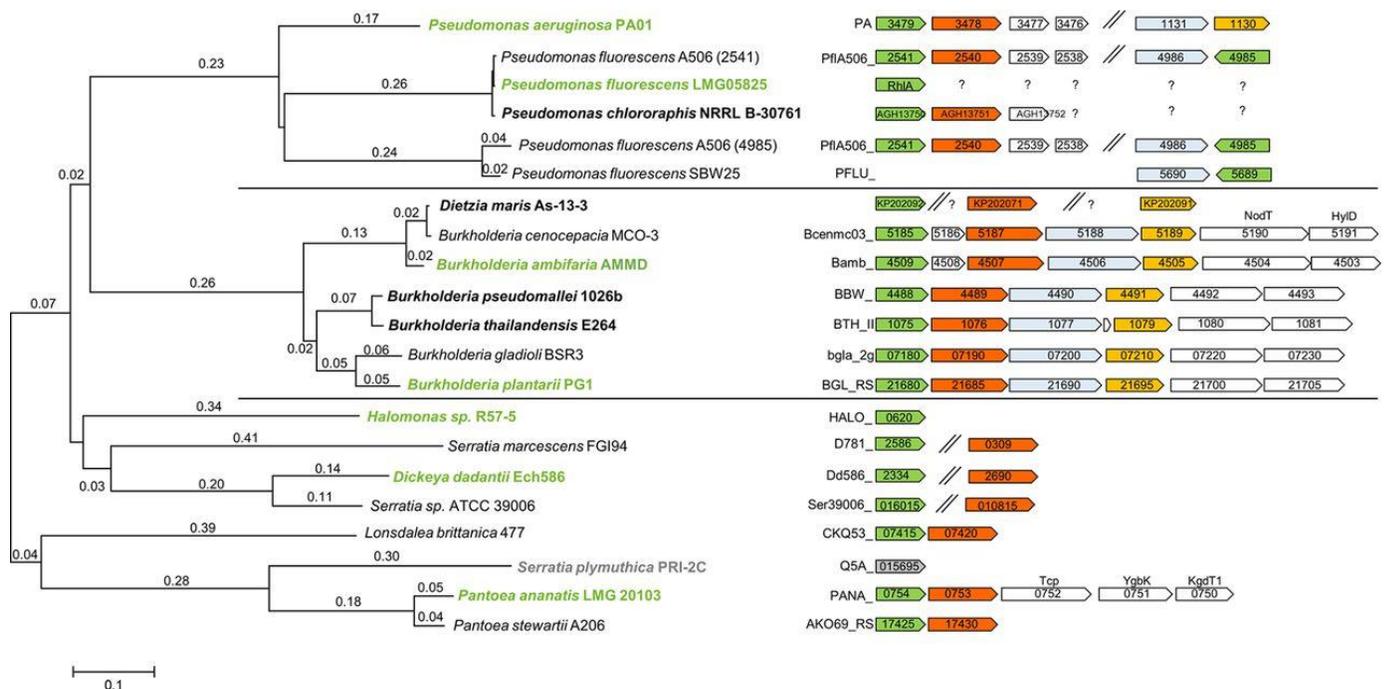


Figure 1.5 : Phylogénie de l'opéron *rhlABC* selon la séquence en acides aminés (Germer et al. 2020), les noms en verts et gras proviennent de la figure originale, mais ne sont significatives dans le contexte de cette étude

1.2.5 Régulation générale et utilité des rhamnolipides chez *P.aeruginosa* et *B.thailandensis*

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans la production des rhamnolipides et des biosurfactants en général. Les conditions de culture, la souche sélectionnée, le substrat et la méthode de production choisie peuvent tous influencer leurs productions (Marchant and Banat, 2012, Marchant et al., 2014). D'autres paramètres tels que la source de carbone, d'azote, le pH, la température, les métaux traces, l'oxygène/accepteur d'électrons et l'agitation peuvent affecter la production des biosurfactants (A.I. Adetunji et A.O. Olaniran, 2021). Dans le cas des rhamnolipides, leur production est sous le contrôle de systèmes de *quorum sensing* distincts chez *P. aeruginosa* et *B. glumae* (Soberón-Chávez et al., 2005; Majerczyk et al., 2014a; Nickzad et Déziel, 2016). Dans le cas de *B. thailandensis*, quoique qu'il y ait une relation qui a déjà été notée entre le *quorum sensing* et la biosynthèse des rhamnolipides, il y a très peu d'informations sur la manière dont le *quorum sensing* affecte la production des rhamnolipides (Majerczyk et al., 2014b; Irorere et al., 2019, Martinez et al. 2020).

Quant à l'utilité des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, ceux-ci sont importants pour la motilité de type *swarming*, la formation des biofilms et en tant qu'hémolysine (Köhler et al. 2000; Davey et al. 2003; Tremblay et al. 2007), ce qui les rend importants en tant que facteur de virulence (Kownatzki et al. 1987). De plus, les rhamnolipides permettent à *P. aeruginosa* de se protéger de la phagocytose par les macrophages et de se protéger du système immunitaire de son hôte (McClure and Schiller 1996; van Gennip et al. 2009; Alhede et al. 2009). Finalement, les rhamnolipides améliorent l'utilisation des substrats hydrophobes comme les longues chaînes d'alcane et l'octadécane (Zhang and Miller 1995; Al-Tahhan et al. 2000; Noordman and Jassen 2002).

1.2.6 Le cas particulier de *Pantoea ananatis*

Pantoea ananatis est un phytopathogène à spectre large (Coutinho et al. 2009), qui produit un biosurfactant nommé ananatoside (Stavrinides et al. 2016; Gauthier C et al. 2019). Cette souche est particulière, car elle possède les gènes *rhlAB* (Stavrinides et al. 2016), mais ne produit pas de rhamnolipides. En effet, elle produit plutôt un glucolipide (un dextrose au lieu du rhamnose) et un macrolactone-glycolipide (qui n'est pas un biosurfactant, mais possède du potentiel médical) qui ont été nommés ananatoside B et A respectivement (Gauthier C. et al. 2019). Cette découverte révèle que la présence de gènes homologues à *rhlA* et *rhlB* ne garantit pas que le glycolipide produit sera un rhamnolipide. La structure des ananatosides est présentée dans une

figure adaptée (Cloutier M. et al. 2021) contenant aussi la structure d'un rhamnolipide de *P.aeruginosa*.

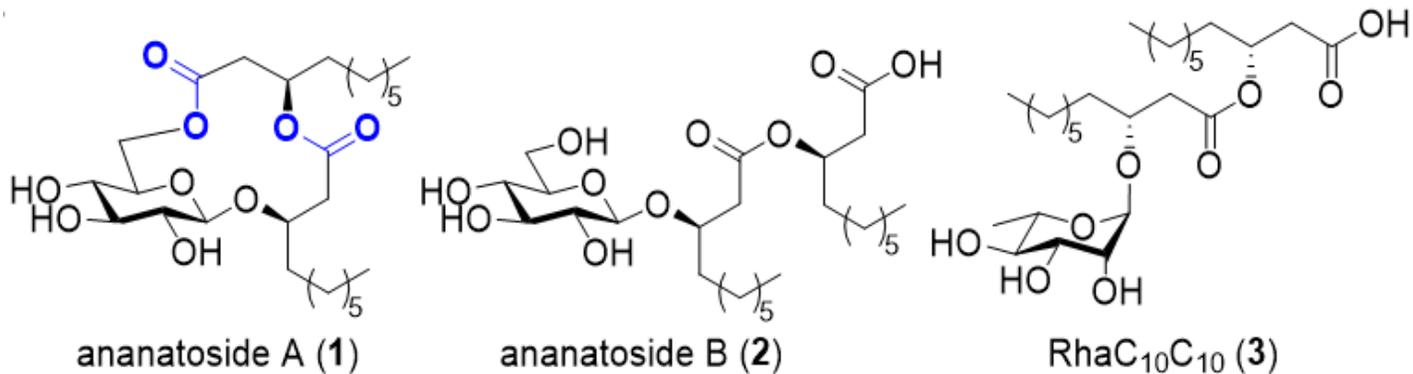


Figure 1.6 : Produits de l'opéron *rhlAB* de *Pantoea ananatis*, l'ananatoside A et B, avec un rhamnolipide de *P.aeruginosa* ,

(Cloutier M. et al. 2021)

1.3 Le genre *Burkholderia*

Burkholderia est un genre bactérien qui longtemps été nommé *Pseudomonas* (par exemple, *Pseudomonas cepacia* au lieu de *Burkholderia cepacia*). En revanche, des analyses de l'ARN 16S, des homologues de séquence ADN-ADN et d'autres études caractéristiques (phénotypiques, compositions en acide gras et lipides cellulaires) ont conduit, dès 1992, à la distinction des deux genres (Yabuuchi et al. 1992). Ce sont des bactéries à Gram négatif aérobie strictes dont certaines espèces peuvent survivre, mais pas croître, dans des conditions anoxiques (Eshwar Mahenthiralingam et al. 2013). De plus, plusieurs membres de ce groupe se retrouvent dans l'environnement naturel du sol et sont des pathogènes humains (notamment le BCC, des pathogènes opportunistes, ou les espèces *B. pseudomallei* et *B. mallei* des pathogènes pour les humains et animaux) ou des phytopathogènes tels que *B. glumae* ou *B. cepacia*. C'est un genre bactérien naturellement résistant à de nombreux antibiotiques.

1.3.1 Le *Burkholderia cepacia* complex et *Burkholderia cenocepacia*

L'espèce bactérienne *Burkholderia cenocepacia* fait partie du BCC (Dalmastrri et al. 2003; Vandamme et al. 2003), qui regroupe à l'heure actuelle au moins 22 espèces de *Burkholderia*, génétiquement et phénotypiquement proches, et dont la plupart sont retrouvées dans l'environnement. Ce sont des espèces similaires à un point que l'identification par ARN 16S n'est pas suffisante et qu'il faut les identifier à partir de hautes valeurs d'hybridation ADN-ADN interspèces (Coenye T. et al. 2001) D'ailleurs, il est important de mentionner que les espèces

B. mallei, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* et *B. glumae* n'en font pas parti malgré le partage de certaines caractéristiques (production de biosurfactants et résistance naturelle à de nombreux antibiotiques entre autres). Certains membres des BCC, en particulier *B. cenocepacia*, sont capables de causer des infections chroniques chez les gens atteints de fibrose kystique (aussi appelé mucoviscidose). De plus, elles sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques (Shatalin et al. 2011). *B. cenocepacia* est l'une des espèces de BCC les plus représentées dans les cas de patients atteints de fibrose kystique infectés par une BCC (Lipuma 2010). Les BCC sont d'ailleurs capables de coexister avec *P. aeruginosa* dans les poumons des individus atteints de cette maladie (Carmody et al. 2015; Harrison 2007; Schwab et al. 2014) mais les interactions ne sont pas directes (Schwab et al. 2014). *Burkholderia cenocepacia* est également capable d'afficher une motilité de type *swarming*, et vraisemblablement de produire un biosurfactant (Bernier and Sokol 2005; Bernier, Nguyen, and Sokol 2008).

1.4 Le Quorum Sensing

Le *quorum sensing* est un mode de communication entre les individus formant une communauté de microorganismes qui permet de coordonner l'expression de certains gènes au sein de cette population (W. C. Fuqua, Winans, et Greenberg 1994). C'est un système qui a été décrit pour la première fois chez *Vibrio* (renommé *Allivibrio*) *fischeri*, une bactérie bioluminescente vivant en symbiose avec divers animaux marins, en particulier le petit calmar *Euprymna scolopes*, et qui produira sa luminescence lorsqu'elle atteindra une forte densité de population (Nealson, 1977). En effet, ce système de régulation, qui permet à la bactérie *V. fischeri* d'évaluer la densité de sa population bactérienne via la concentration d'une molécule signale, se nomme *quorum sensing* (Fuqua et al. 1994). Une fois la concentration de cette molécule suffisamment élevée, cela va induire l'expression de certains gènes, dont celui de la bioluminescence.

On sait maintenant que de nombreux systèmes de *quorum sensing* existent et qu'ils soient différents selon que la bactérie soit à Gram positif ou à Gram négatif, ici on se concentrera sur le système typique des Proteobacteria. Dans cette classe, les molécules de signalisation les plus communes appartiennent à la famille des N-acyl-homosérine-lactones (AHL) (Fuqua et Greenberg 1998). Les molécules d'AHL diffusent dans le milieu environnemental. En augmentant la densité de la population bactérienne, la concentration de ces AHL va augmenter dans le milieu extérieur au point de pouvoir revenir dans le cytoplasme des bactéries par diffusion. Les AHL, vont alors activer une réponse de type LuxR en s'y fixant (LuxR est le transcripteur qui régule la production de AHL, via LuxI, et perçoit la molécule AHL pour le *quorum sensing* et l'activation de gènes cibles). La figure 1.7 (Wang et al. 2018) décrit cette séquence de *quorum sensing*.

Cette activation du *quorum sensing* va permettre, de manière générale, la régulation de nombreux gènes étant impliqués dans la production de facteurs de virulence (Passador et al. 1993), la résistance aux antibiotiques (Que et al. 2013), la maturation des biofilms (Stanley and Lazazzera 2004) et la régulation des gènes du *quorum sensing* lui-même en faisant un effet de boucle d'autorégulation positive (comme décrit chez *Vibrio fischeri*) (Fuqua et Greenberg 2002) ou parfois même négative. Le *quorum sensing* peut également réguler la production des rhamnolipides, phénomène notamment décrit chez la bactérie de référence de notre laboratoire, *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner et Reiser 1995). Dans le cas de *B.cenocepacia*, le *quorum sensing* est régulé par un système CepI/CepR et par de l'acide cis-2-dodecenoïque (le facteur signal diffusible du genre *Burkholderia*, BDSF), deux systèmes distincts qui favorisent les facteurs de virulence, la mobilité et les protéases, alors qu'ils inhibent la formation de biofilm, lorsqu'actives (Eberl L. et al. 2013).

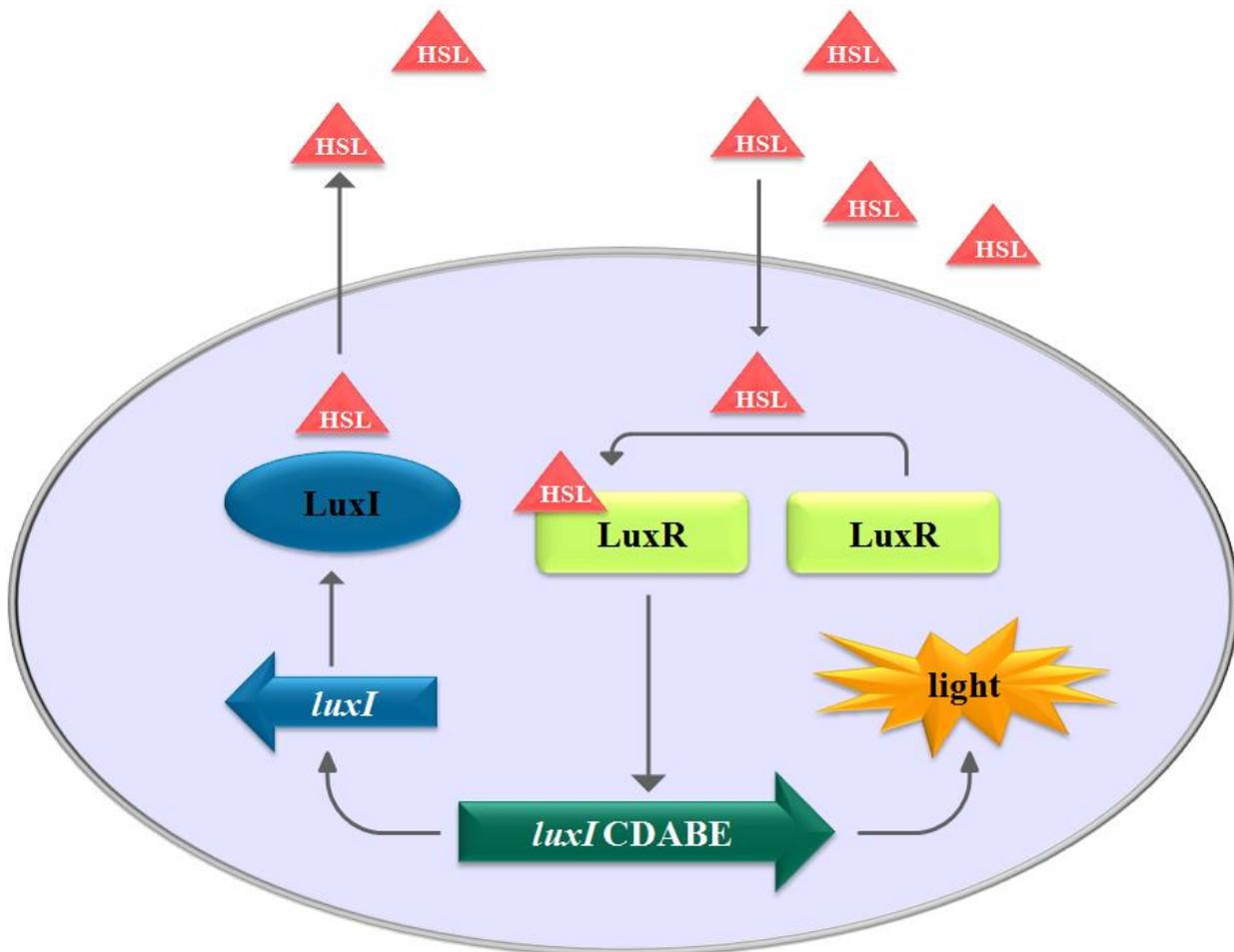


Figure 1.7 : Schéma du *quorum sensing* selon le modèle *Vibrio fischeri*

1.5 La motilité de type *swarming*

Le *swarming* est une motilité de type social. Elle requiert la présence d'un surfactant (qui agit comme agent mouillant et pour abaisser la tension de surface) et un ou des flagelle(s) fonctionnel(s). C'est un mouvement coordonné de bactéries sur une surface semi-solide (généralement 0,5% d'agar). Le phénotype de bactéries qui forment une colonie en *swarming* est très différent des bactéries de la même espèce non mobile ou en croissance en milieu liquide. En effet, celles-ci peuvent, mais ce n'est pas toujours le cas, être hyperflagellées, allongées, multinucléées, et produisent un biosurfactant (Kearns, 2010). Cette manifestation sociale permet de révéler la production d'un biosurfactant, et donc sa surproduction ou même la délétion d'un gène essentiel à sa production. Pour un exemple de colonie *swarming*, voir figure 1.9 de la section 1.9.

1.6 Les biofilms

Les biofilms sont aussi une forme de vie sociale exprimée par les bactéries, mais il est complètement opposé au phénotype de *swarming*. En effet, alors que les bactéries en *swarming* sont mobiles et actives, les bactéries en biofilm sont immobiles et majoritairement en dormance (Lewis 2005). La formation d'un biofilm se présente en 5 phases telles que présentées à la figure 1.8 (Tremblay et al. 2014) : Attachement initial, attachement irréversible, croissance, maturation et dispersion. Les biofilms peuvent aussi se présenter sous forme de pellicule à la surface des milieux de culture ou dans l'environnement tel qu'observé dans notre laboratoire. Les biofilms se forment par l'agrégation de bactéries qui s'enveloppent d'une matrice extracellulaire d'exopolysaccharides (EPS) produite par ces mêmes bactéries (Branda et al. 2005; Hall-Stoodley et Stoodley 2009). Les biofilms offrent aussi plusieurs avantages dont la résistance accrue aux antibiotiques, la protection contre les protozoaires et contre les défenses immunitaires (Mah and O'Toole 2001; Matz et Kjelleberg 2005; Anderson et O'Toole 2008). Plusieurs éléments, dont les biosurfactants, composent et régulent la maturation, le maintien et le détachement des biofilms (Pamp SJ, Tolker-Nielsen T, 2007).

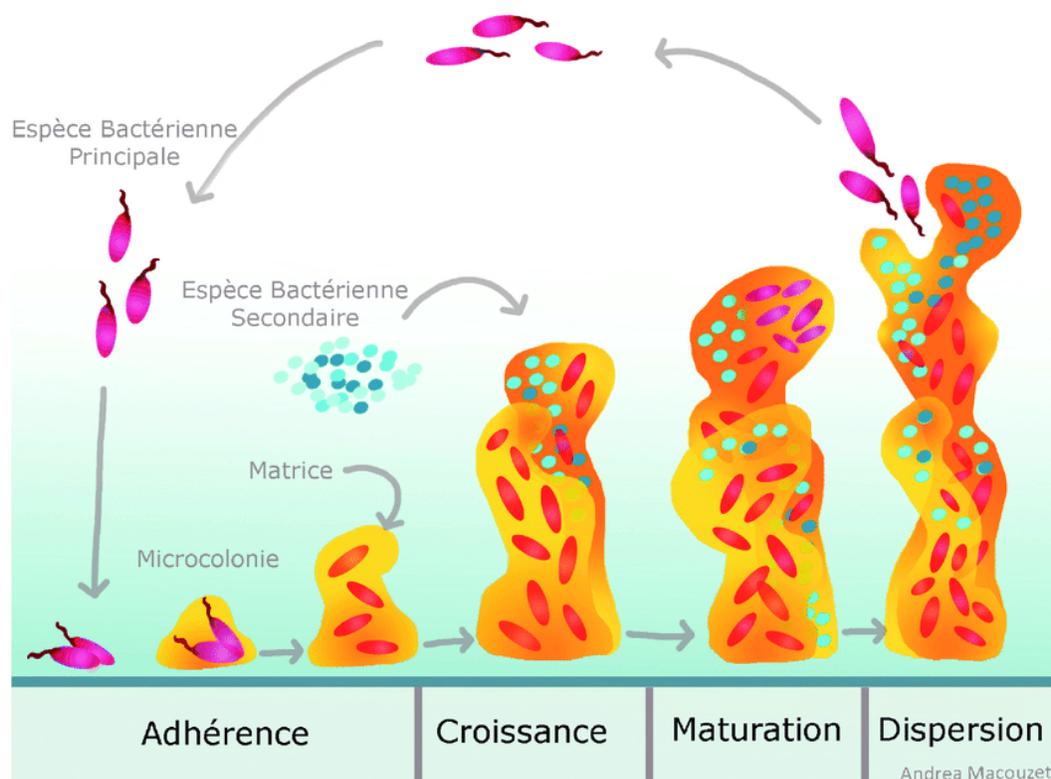


Figure 1.8 : Schéma de formation d'un biofilm (Tremblay et al. 2014)

1.7 Méthodologie d'extraction des rhamnolipides

Les méthodes d'extractions varient, mais restent relativement autour du même principe en ce qui concerne les rhamnolipides. La méthode traditionnelle pour avoir un produit pur est la précipitation à pH 4 avec HCl 2N suivi de plusieurs extractions avec un solvant tel que l'acétate d'éthyle (Déziel et al. 1999). Cette méthode semble optimale pour les rhamnolipides de *P. aeruginosa* et d'autres glycolipides similaires, comme celui de *Pantoea ananatis*. En effet, une méthode similaire a été utilisée sur *Pantoea ananatis* (voir section 1.2.6 pour les détails), un phytopathogène à spectre large (Coutinho et al. 2009), qui produit un glucolipide nommé ananatoside qui s'extrait en acidifiant à pH 2-3 le surnageant avec du HCl pour ensuite extraire le précipité avec de l'acétate d'éthyle (Stavrínides et al. 2016; Gauthier C. et al. 2019).

1.8 Méthodologies de détection des biosurfactants

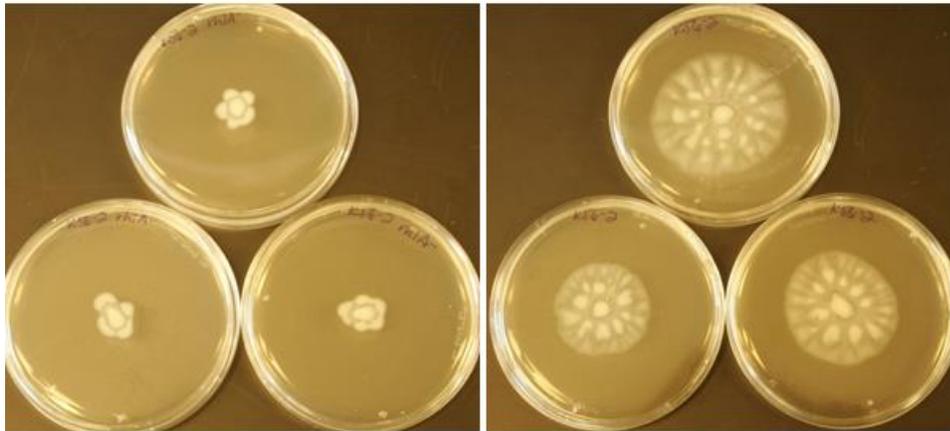
Il existe plusieurs méthodes pour détecter un biosurfactant produit par une bactérie. Tout d'abord il y a la motilité de type *swarming*, que l'on peut observer sur géloses d'agar 0,5% puisque la production d'un biosurfactant y est essentielle pour observer le phénotype (Köhler et al. 2000). Quoique non-spécifique (Youssef et al., 2004, Satpute et al., 2008) un test d'hémolyse peut aussi

être utile dans certains pour détecter un biosurfactant (Mulligan et al. 1984) surtout lorsqu'on peut comparer une souche sauvage produisant du biosurfactant avec un mutant qui n'en produit pas. Il existe aussi les géloses contenant du CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) pour détecter certains glycolipides (Siegmond et Wagner, 1991). Les bactéries produisant un biosurfactant auront un halo bleu foncé autour des colonies. Néanmoins le CTAB peut être toxique pour certaines bactéries (Soltanighias et al., 2019), celui-ci peut néanmoins être remplacé par un autre détergent. Le *drop collapsing test* permet de détecter une molécule qui abaisse la tension de surface dans un surnageant (Jain et al., 1991). Il suffit de déposer une goutte sur une surface d'huile et la présence d'un biosurfactant dans la goutte va provoquer l'affaissement de celle-ci sur l'huile (Jain et al., 1991, Bodour et Miller-Maier, 1998, Walter et al., 2010). Finalement, une nouvelle méthode sensible et versatile consiste à vaporiser une fine couche d'huile sur la surface des géloses (voir section 2.5) afin de détecter la diffusion de molécules tensio-actives dans l'environnement entourant la colonie (Burch et al. 2010). Cette méthode a été améliorée dans le laboratoire Déziel en ajoutant un colorant lipophile pour accroître le contraste (Martinez et al. 2020).

1.9 Les travaux précédents ma maîtrise dans notre laboratoire

Quelques travaux ont été effectués sur ce sujet avant le début de cette maîtrise. Tout d'abord il y a eu construction d'un mutant *rhlA*- de la souche K56-2 de l'espèce *B. cenocepacia*. La perte du phénotype swarming de ce mutant a confirmé que le produit du gène *rhlA* est impliqué dans la production d'un biosurfactant chez cette souche. Afin d'identifier le biosurfactant, il y a eu extractions de géloses, extractions de surnageants de cultures, analyses par HPLC (High Liquid pressure chromatography) et spectromètre de masse. La seule conclusion qui en ressort est que *B. cenocepacia* K56-2 ne produit pas de rhamnolipides comme ceux retrouvés chez *P. aeruginosa* ou *B. thailandensis* et *B. glumae*. De plus, même s'il était possible de détecter par des méthodes d'aérolisation sur géloses, de diffusion du surnageant dans les géloses et le *swarming*, il semble qu'il n'y ait pas assez de produits par rapport au mutant *rhlA*- pour être en mesure d'identifier des pics de masse au spectromètre ou au HPLC. Même les méthodes d'extraction usuelles ne révélaient rien sur chromatographie par couche mince. Il a alors été conclu que plus de matériel à analyser était requis pour être en mesure d'avoir des pics ou des révélations claires, et éventuellement identifier ce biosurfactant inconnu. De plus, tel que présenté plus tôt (voir section 1.2.4), *B. cenocepacia* K56-2 présente un opéron *rhlABC* possédant potentiellement un gène supplémentaire, une méthyltransférase hypothétique. Avec un mutant du gène *rhlA*, *B. cenocepacia* perd sa mobilité de type *swarming*, voir figure 1.9, ce qui prouve la

présence d'un biosurfactant produit par cette espèce. Néanmoins, les analyses faites avant et durant ma maîtrise ont démontré que ce n'est pas un rhamnolipide ni un ananatoside B.



Marie-Christine Groleau, laboratoire Déziel

Figure 1.9 : Présentation de la perte du phénotype swarming de *B. cenocepacia* K56-2 chez un mutant *rhIA*- (à gauche) comparativement à la souche sauvage (à droite)

1.10 Hypothèse et objectifs du projet

Hypothèse : La raison pour laquelle le biosurfactant de *Burkholderia cenocepacia* K56-2 n'a pas encore été identifié est parce qu'il n'est pas produit en concentrations suffisantes pour permettre sa purification et son identification dans les conditions usuelles de cultures. Les conditions de culture initiales seraient alors à améliorer ou la transcription des gènes à augmenter. Il faudrait optimiser les conditions de culture par une nouvelle méthode pour y arriver.

Objectif #1 : Développer un rapporteur transcriptionnel par une fusion entre le promoteur de l'opéron *rhIABC* et opéron *lux*.

Objectif #2 : Optimiser au mieux le milieu de culture et les conditions de production du biosurfactant en utilisant le rapporteur comme outil de suivi.

Objectif #3 : Extraire, purifier et identifier le biosurfactant inconnu de *B. cenocepacia* K56-2 grâce aux conditions de culture optimisées.

Chapitre 2: Matériels et méthodes

2.1 Stratégie générale du projet

L'objectif ultime de ce projet étant d'identifier le biosurfactant produit par *B. cenocepacia* K56-2, la stratégie choisie fut de développer et employer un rapporteur transcriptionnel révélant l'expression de l'opéron codant pour les enzymes requises pour sa synthèse. Le plasmide Mini-CTX-*lux* (Becher A. et al. 2018) permet, grâce au site d'insertion du phage CTX, d'intégrer une copie du plasmide dans le chromosome d'une bactérie qui possède le site d'insertion. En intégrant un promoteur en amont de l'opéron *luxCDABE* (voir figure 2.1 et figure 2.2), on peut relier la transcription d'un gène/opéron à celui de l'opéron *lux*. Cet opéron produira l'enzyme luciférase ainsi que son substrat pour produire de la lumière qui pourra être mesurée avec un appareil qui permet de mesurer la lumière produite dans des microplaques de 96 puits. Dans le cadre de ce projet, le promoteur situé en amont du gène *rhIA* de *B. cenocepacia* K56-2 a été cloné dans ce plasmide et utilisé afin d'optimiser le milieu de culture, et ultimement la production du biosurfactant. De plus, les séquences FRT du plasmide permettent de retirer la cassette de résistance du plasmide pour rendre la construction propre et beaucoup plus fiable en termes de transcription.

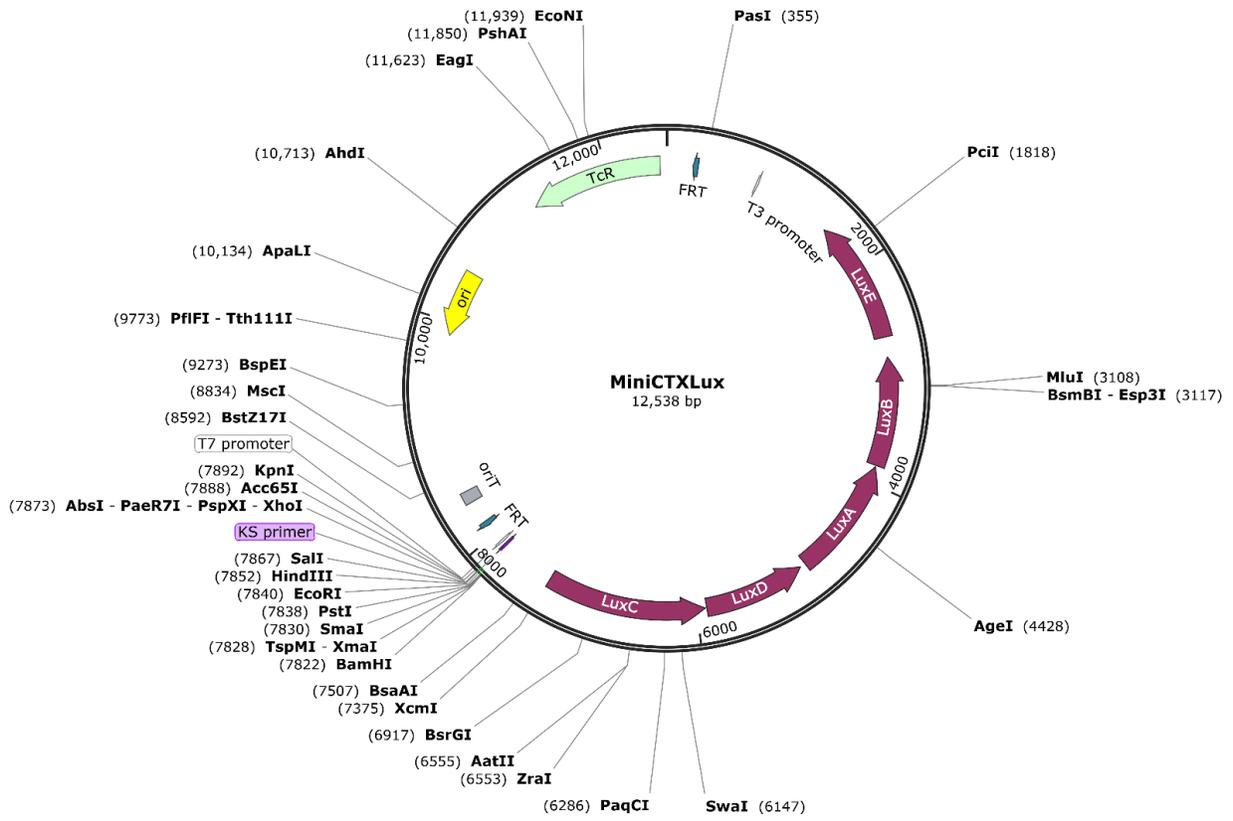


Figure 2.1 : Carte du plasmide Mini-CTX-*lux* vide

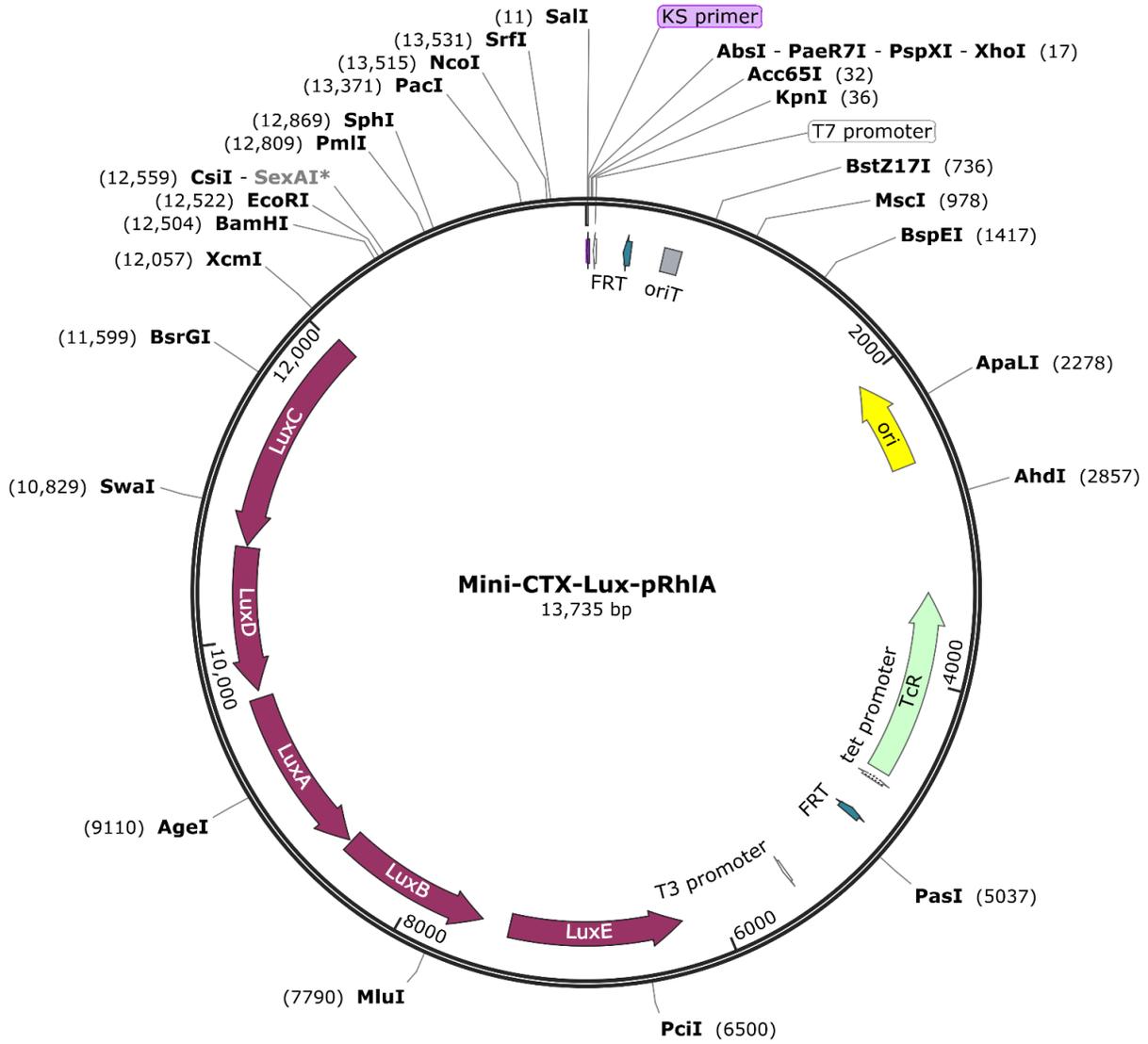


Figure 2.2 : Carte du plasmide Mini-CTX-lux avec insertion du promoteur *pRhI*

2.2 Souches et plasmides du projet

Les souches suivantes ont été utilisées durant le projet :

Souche	Description	Référence ou source
<i>E. coli</i>		
DH5 α (ED78)	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
SM10 (ED222)	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r λpir</i>	Simon <i>et al.</i> (1983)
S17-1 (ED221)	Smr Tpr <i>mod⁺res thi pro recA hsdR17</i> , integrated plasmid RP4-TC::Mu-, Km::Tn7 into genome	Simon <i>et al.</i> (1983)
χ 7213 (ED743)	<i>thr-1 leuB6 fhuA21 lacY1 glnV44 recA1 ΔasdA4 Δ(zhf-2::Tn10) thi-1 RP4-2-Tc::Mu [λ pir]</i>	Collection du labo
HPS1 (ED1059)	<i>e14⁻ (mcrA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) rif zxx::miniTn5Lac4 (lacI^q lacZΔM15) uidA::pir116 zdg-232::Tn10</i>	Kang, Yun <i>et al.</i> (2007)
<i>B. cenocepacia</i>		
K56-2 (ED325)	CF sputum isolate (Canada); ET12 lineage; <i>cblA⁺recA</i> subgroup A	Mahenthiralingam <i>et al.</i> (2000)
K56-2 <i>rhIA</i> - (ED2107)	K56-2 <i>rhIA::pKnock-tc</i>	Collection du labo
<i>cepl</i> - (ED821)	K56-2 <i>cepl::pKnock-tc</i>	Pamela Sokol, Université de Calgary
<i>cepR</i> - (ED820)	K56-2 <i>cepR::pKnock-tc</i>	Pamela Sokol, Université de Calgary
<i>P. aeruginosa</i>		

PA14 (ED14)	Isolat clinique UCBPP-PA14	Rahme <i>et al.</i> (1995)
PA14 <i>rhlA</i> - (ED5)	Mutant rhamnolipide-négatif de PA14 carb	Collection du labo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 (ED2207)	Isolat clinique d'urine à Portland	Commercial ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman (ED94)	Isolat clinique Newman	Duthie ES <i>et al.</i> (1952)

Les plasmides suivants ont été modifiés ou utilisés durant le projet (voir annexe 3 pour les cartes des plasmides) :

Plasmide	Description	Sites de restriction utilisés pour la construction	Référence ou source
pEasy	Plasmide commercial pour sous-clonage		pEASY-T1 Cloning Kit (TransGen)
pEasy- <i>Prhl</i>	pEasy contenant la région intergénique en amont de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2	KpnI et EcoRI	Cette étude
Mini-CTX- <i>lux</i>	Plasmide pour construction d'une fusion transcriptionnelle avec les gènes <i>luxCDABE</i> et la région intergénique en amont de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2	Hind III	T T Hoang <i>et al.</i> (2000)
Mini-CTX- <i>Prhl-lux</i> (pXP1)	Mini-CTX- <i>lux</i> contenant la région intergénique en amont de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2 en amont de l'opéron <i>lux</i>	BamHI et KpnI pour la région promotrice	Cette étude
pFTP1	Source de la cassette Tp^R		Choi KH <i>et al.</i> (2005)
pBBR5 ::Flippase Tc^R/Gen^R	Plasmide pBBR5 contenant une flippase spécifique aux sites FRT	MluI et XhoI pour la cassette Tc^R	Léo Eberl (Université de Zürich)
pBBR5 ::Flippase Gen^R	Plasmide pBBR5 contenant une flippase spécifique aux sites FRT		Léo Eberl (Université de Zürich)
pBBR5 ::Flippase Tp^R/Gen^R (pXP2)	Plasmide pBBR5 contenant une flippase spécifique aux sites FRT contenant une cassette de résistance à la triméthopime	NcoI et Bam pour la cassette Tp^R	Cette étude

Les souches suivantes sont les souches que j'ai créées et/ou transformées durant ce projet :

Souche	Description
ED4431	<i>E. coli</i> DH5 α avec Mini-CTX- <i>lux</i> contenant la région promotrice de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2. Tc ^R (pXP1)
ED4432	<i>E. coli</i> DH5 α avec pEasy contenant la région promotrice de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2. Kan ^R (pXP1)
ED4433	<i>E. coli</i> DH5 α avec pEasy, Kan ^R
ED4434	<i>E. coli</i> SM10 avec Mini-CTX- <i>lux</i> contenant la région promotrice de l'opéron <i>rhlABC</i> de <i>B. cenocepacia</i> K56-2. Tc ^R (pXP1)
ED4435	<i>E. coli</i> SM10 avec Mini-CTX- <i>lux</i> vide. Tc ^R
ED4437	<i>E. coli</i> χ 7213 avec plasmide pBBR5 Flippase Tp ^R /Gen ^R (pXP2)
ED4438	<i>E. coli</i> S17-1 avec pBBR5 Flippase Tp ^R /Gen ^R (pXP2)
ED4439	<i>E. coli</i> DH5 α avec pBBR5 Flippase Gen ^R
ED4440	<i>E. coli</i> DH5 α + pBBR5 Flippase Tc ^R /Gen ^R (pXP2)
ED4441	<i>B. cenocepacia</i> K56-2 ::CTX- <i>lux</i> Tc sensible
ED4442	<i>B. cenocepacia</i> K56-2 ::CTX- <i>PrhIA-lux</i> Tc sensible

2.3 Milieux de culture

Milieu Difco™ Tryptic soy broth (TSB)

Sa composition par litre est la suivante : 17 g tryptone, 3 g soytone, 2,5 g dextrose, 5 g chlorure de sodium et 2,5 g phosphate de dipotassium

Milieu BD Difco Nutrient Borth (NB) + 0,5% dextrose

Sa composition par litre est la suivante : 5 g peptone, 5 g extrait de bœuf, 5 g dextrose.

Milieu Lysogeny Broth (LB)

Sa composition par litre est la suivante : 10 g peptone, 5 g extrait de levure et 5 g NaCl

Milieu M9 dextrose

75,2 g/L Na_2HPO_4 , 30 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L NaCl, 5 g/L NH_4Cl , 5 g/L dextrose. Stérilisation par autoclave. Ceci donne un stock 10X à diluer avec de l'eau distillée stérile.

Ajout de 10 mL/L d'une solution métaux traces 100x, 300 μL CaCl_2 1M et 1mL MgCl_2 1M après autoclave

Recette pour la solution de métaux traces 100x : Solution concentrée 100X de minéraux en traces (stock en 100 mL) : 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Milieu M9 Base pour variations

Voir Milieu M9 dextrose, mais **ne pas ajouter** de dextrose ni de NH_4Cl

Milieu BSM Proline-Leucine

Préparation des solutions stock

1) Tampon phosphate (20X) : 8.5 g K_2HPO_4 + 2 g NaH_2PO_4 , compléter à 100 mL avec de l'eau d'osmose inverse (stock 20X), stérilisation par autoclave.

2) NH_4Cl (20X) : 4 g dans 100 mL d'eau d'osmose inverse (stock 20X), stérilisation par autoclave.

3) Acide nitrilotriacétique stock (100X) : 1 g dans 100 mL d'eau d'osmose d'inverse, stérilisation par autoclave.

4) Acides casamino (5%) : 5 g dans 100 mL d'eau d'osmose inverse, stérilisation par autoclave.

5) Extrait de levure (5%) : 5 g dans 100 mL d'eau d'osmose inverse, stérilisation par autoclave.

6) Solution de minéraux en traces (100X) pour 100mL d'eau d'osmose inverse :

2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

0,12 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$

0,03 g $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$

0,03 g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$

0,01 g $CoSO_4 \cdot 7 H_2O$

Stérilisation par filtration.

Pour préparer 100 mL de Milieu BSM Proline Leucine il faut ensuite mélanger 5 mL des solutions 1 et 2 puis 1 mL de chacune des 4 autres solutions. Enfin, il faut compléter le milieu avec 86 mL d'eau d'osmose inverse, 0,728 de leucine, 0,640g de proline et stériliser par autoclave.

2.4 Courbes de croissance de différents mutants de *B.cenocepacia* K56-2

Les précultures des souches bactériennes à tester ont été réalisées dans le milieu TSB pendant environ 16 heures à partir de la réserve congelée à -80°C.

Les essais de croissance ont été effectués avec un appareil Bioscreen C MBR (Growth Curves USA) qui permet de mesurer la croissance en continu.

Toutes les souches ont été cultivées en 5 répliques par milieu. Les précultures ont été diluées 100X dans le milieu pour un volume final de 200 µL par puit sans lavage. Elles ont ensuite été incubées dans l'appareil à 37°C pendant 48 heures avec des prises de mesure Wideband 420-580 nm aux 30 minutes et agitation avant les mesures. Les milieux testés ont été le NB, NB+0,5% dextrose et le TSB.

2.5 Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour différents antibiotiques.

Toutes les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées sur géloses TSB puis confirmées en milieu TSB liquide en tube. Les incubations ont été de 48h pour *B.cenocepacia* K56-2 et de 24h pour les souches d'*E.coli* S17-1, SM10 et χ 7213. Les incubations en milieu TSB liquide en tube se faisaient à 37°C sous agitation et ont été lancées à partir de la réserve congelée à -80°C.

Pour *E.coli*, les CMI ont été confirmées sur les souches S17-1, SM10 et χ 7213 (avec DAP) pour tous les antibiotiques suivants : triméthoprime, tétracycline et gentamicine.

Pour *B.cenocepacia* K56-2 plusieurs antibiotiques ont été testés soient : glyphosate, tétracycline, carbenicilline, kanamycine, zeocine, penicilline G, neomycine, polymixine B et gentamicine.

2.6 Vaporisation à l'huile de géloses pour détection du biosurfactant

Environ 0,5 g de Sudan IV ont été mélangés avec 100 mL d'huile minérale à l'aide d'un bain sonicateur et manuellement. L'huile colorée a été placée dans un vaporisateur pour chromatographie sur couche mince (TLC) est connecté à une prise d'air comprimé. La surface des géloses contenant des colonies a été délicatement vaporisée. S'il y avait présence du surfactant, une auréole d'huile émulsifiée se formait autour des colonies bactériennes.

2.7 Essais de production du surfactant sur géloses sang

Voici les recettes des quatre milieux utilisés pour cet essai :

Géloses sang :

Toutes les recettes sont pour 40 géloses et préparer avec de l'eau d'osmose inverse :

Milieu 1 : mélanger 950 mL d'eau, 15 g d'agar, 10 g d'extrait de viande, 10 g de peptone, 5 g de NaCl. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 50 mL de sang de mouton défibriné (Oxoid).

Milieu 2 : mélanger 750 mL d'eau, 10 g de peptone, 10 g d'extrait de levure, 15 g d'agar. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 50 mL de sang de mouton défibriné (Oxoid) et 200mL de dextrose 15% filtré.

Milieu 3 : mélanger 950 mL d'eau, 15 g d'agar, 10 g d'extrait de viande, 10 g de peptone, 5 g de NaCl. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 50 mL de sang de cheval défibriné (Oxoid).

Milieu 4 : mélanger 750 mL d'eau, 15 g d'agar, 10 g de peptone, 10 g d'extrait de levure. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 50 mL de sang de cheval défibriné (Oxoid) et 200mL de dextrose 15% filtré.

Des précultures sur la nuit des souches d'intérêts ont été préparées dans 5mL de milieu TSB. Une goutte de 5 μ L a été déposée sur la surface des géloses fraîchement préparées. Les géloses ont séché sans couvercle dans une enceinte de sécurité biologique pour éviter la condensation. Ensuite, elles ont été incubées à 37°C et l'hémolyse a été observée pendant 24-48 heures et 96 heures ont passé avant la vaporisation à l'huile pour détecter le surfactant. Le détail des souches utilisées est dans la section résultat 3.3.

2.8 Essais de production du biosurfactant par *swarming* sur gélose

Des géloses ont été préparées pour les différents milieux listés plus bas. Une série a été préparée avec 0.5 % agar pour permettre le *swarming* tandis que l'autre série a été préparée avec 1,5 % d'agar. Chaque milieu a été séché sans couvercle pour 60 minutes dans une enceinte de sécurité biologique. Ensuite, 5 µL d'une préculture ont été déposés au centre de la gélose et séchés quelques minutes. Les géloses sont ensuite incubées pendant 48h à 37°C dans un sac plastique en empilant un maximum de deux géloses à l'endroit.

Milieux utilisés avec eau d'osmose inverse :

- 1) Sang : 475 mL d'eau, 5 g d'extrait de boeuf, 5 g peptone, 2,5 g NaCl. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 25 mL de sang de mouton défibriné (Oxoid).
- 2) Sang avec dextrose : Idem que 1) avec ajout de 2,5 g de dextrose avant l'autoclave.
- 3) NB: 500mL eau, 4g de poudre NB puis stérilisation par autoclave
- 4) NB avec dextrose : Idem que 3) avec 2,5 g de dextrose à ajouter avant l'autoclave
- 5) Milieu ASM (Kirchner, Sebastian et al. 2012) sans mucine et sans dextrose : 400 mL d'eau, 1,1 g KCl, 2,5 g NaCl, 0,7 g d'ADN de sperme de saumon (Sigma), 2,5 g d'acides casamino, 750 µL d'acide diethylenetriaminepentaacétique (DTPA) à 5,9 mg/mL. Stériliser à l'autoclave puis ajouter 100 mL d'eau contenant 5 g de sérum d'albumine bovin, 1mL de CaCl₂ 1M à filtrer et 2,5mL d'émulsion de jaune d'œuf commercial.
- 6) Milieu ASM sans mucine avec dextrose : Idem que 5) avec 2,5 g de dextrose à ajouter avant autoclave.
- 7) NB dextrose + sang : Idem que 8) avec 2,5 g de dextrose à ajouter avant autoclave.
- 8) NB + sang : 475 mL eau, 4 g de poudre NB. Stériliser par autoclave, laisser refroidir puis ajouter 25 mL de sang de mouton défibriné (Oxoid).

2.9 Extraction rapide de l'ADN génomique

Des précultures ont été préparées à partir des stocks congelés dans 3 mL de milieu TSB et incubées à 37°C pendant environ 16 heures.

Un mL de préculture a été centrifugé à 6000 x g pendant 5 minutes. Le culot a été lavé avec du PBS 1X et suspendu dans un volume final de 500 µL de PBS 1X. Les tubes ont été chauffés à 95°C pendant 10 minutes puis immédiatement déposés dans de la glace pendant 10 minutes. Enfin, les tubes ont été centrifugés à 13 000 x g. Le surnageant a été utilisé comme matrice d'ADN génomique pour la PCR.

2.10 Conditions de PCR optimales pour *B.cenocepacia* K56-2

Mélange de base pour amplification d'un fragment d'ADN de *B.cenocepacia* K56-2:

2,5 µL DMSO

1 µL dNTPs 10mM

1 µL d'amorces forward (d'une dilution 1/10 du stock d'amorces à 100 µM), voir annexe 2

1 µL d'amorces reverse (d'une dilution 1/10 du stock d'amorces à 100 µM), voir annexe 2

5 µL tampon EasyTaq 10x ou 10 µL tampon Fast Pfu Fly 5X

1 µL EasyTaq (TransGen, 5 U/µL, 1 kb/min) ou 1 µL Fast Pfu Fly (TransGen, 1 U/µL, 2kb/min)

1 µL MgSO₄ 100mM

1 µL d'ADN génomique

36,5 µL MilliQ ou 31,5 µL avec Fast Pfu Fly

Programmation du thermocycleur

95°C, 5 min

Début de cycle

95°C, 30 sec

60°C, 40 sec

72°C, à 1 kb/min avec Easy Taq, 2kb/min avec Fast Pfu Fly

Nombre de cycles : 35

72°C, 5 min

2.11 Purification des produits PCR et vérification sur gel.

Lorsque nécessaire, les produits d'amplification ou les plasmides ont été purifiés à l'aide d'une trousse Favorgen selon les recommandations du fabricant. Avant de purifier le produit PCR,

une vérification de l'amplification du fragment d'ADN a été effectuée en mélangeant 5µL de produit PCR avec 1 µL de tampon de chargement qui a été déposé dans un puit d'un gel d'agarose 0,5 %. La migration s'est effectuée pendant 45 minutes à 120 V suivie d'une révélation au GelStain (TransGen) avec appareil à UV. Si une bande était présente, il y avait purification du reste du produit PCR par une trousse Favorgen disponible au laboratoire. Les concentrations ainsi que la pureté (ratio 260nm/280nm) ont été vérifiées par spectrophotomètre Nanodrop.

2.12 Extraction et purification des plasmides

Les plasmides ont été extraits à l'aide d'une trousse disponible au laboratoire selon les recommandations du fabricant. La concentration et pureté (ratio 260nm/280nm) ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop.

2.13 Digestions enzymatiques des plasmides

Les digestions plasmidiques ont été réalisées à l'aide des Enzymes Fast Digest de ThermoScientific selon les recommandations du fabricant avec un temps modifié de 30 minutes d'incubation en utilisant les enzymes décrites dans la section 2.2.

2.14 Purifications sur gel des plasmides et produits PCR

Une trousse Favorgen a été utilisée et les vérifications des concentrations et de la pureté ont été effectuées par spectrophotomètre Nanodrop. Les modifications suivantes ont été apportées pour améliorer le rendement. Tout d'abord, les échantillons ont été migrés 60 minutes à 120 V sur gel d'agarose 0,5%. Généralement, 4 à 8 échantillons de 1 µg par plasmide ou par produit PCR ont été migrés. Ils ont ensuite été purifiés sur gel selon les recommandations du fabricant. Par la suite, les échantillons ont été passés par l'appareil SpeedVac pour retirer un maximum d'eau et les rendre plus concentrés. Pour les produits PCR, il a été nécessaire de faire une nouvelle PCR sur le produit de la purification sur gel pour avoir assez de matériel.

2.15 Préparation de cellules compétentes d'*E.coli* et transformation par choc thermique

À partir d'une préculture d'environ 16 heures d'*E.coli*, une dilution 1 :100 a été effectuée ainsi qu'une incubation de 2-3 h pour obtenir une densité optique d'environ 0,3. Une fois que la densité optique a été atteinte et vérifiée par spectrophotomètre Nanodrop, les tubes ont été déposés sur glace 10 minutes. Par la suite, 1 mL de culture a été centrifugé à 10 000 x g pendant 5 minutes et le surnageant a été décanté. 500 µL CaCl₂ 50mM froid a été ajouté aux cellules pour les resuspendre, puis elles ont été placées sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 10 000 x g pendant 10 minutes et le surnageant a été décanté. Le culot a été resuspendu dans 50 µL CaCl₂ 50 mM froid et laissé sur glace pendant 1 heure. L'ADN transformant a été ajouté aux cellules et mélangé en tapotant le tube avant de les laisser sur glace pendant 40 minutes. Les cellules ont été mises dans un bain-marie à 42°C pendant 50 secondes et placées immédiatement sur glace pendant 1 minute. Finalement, 1 mL de milieu de culture TSB a été ajouté avant de transférer les cellules dans un tube de culture pour les incuber 1 heure à 37°C. Après incubation, les cellules ont été étalées sur trois géloses de sélection avec 10 µL, 100 µL et le reste en concentré par centrifugation.

2.16 Construction du pEasy-PrhIABC

Afin de cloner la région promotrice de l'opéron *rhlABC* dans le Mini-CTX-*lux*, un sous-clonage a d'abord été fait dans le plasmide pEasy. La région promotrice de l'opéron *rhlABC* a été amplifiée par PCR sur l'ADN génomique avec les amorces XP_PrhIaAceno-F et XP_PrhIaAceno-R (Annexe 2). L'hybridation a été faite à 60°C pendant 40 secondes.

Le produit PCR a été purifié tel que décrit précédemment (Section 2.11)

Le clonage dans pEasy a été réalisée avec la trousse commerciale pEasy-T1 Cloning Kit (Trans) selon les recommandations du fabricant en mélangeant : 1 µL de vecteur pEasy, 1 µL de tampon, 1 µL de produit PCR purifié et 3 µL d'eau Milli-Q.

Le mélange a été incubé selon les recommandations du fabricant et transformé par choc thermique dans *E.coli* DH5α (voir section 2.15).

Les transformants ont été sélectionnés sur LB agar contenant 35 µg/mL de kanamycine et 30 µg/mL X-Gal.

2.17 Construction du mini-CTX-PrhIABC-lux

Afin d'assembler le produit PCR comprenant la région promotrice de rhlABC et le plasmide Mini-CTX-lux linéarisé par digestion HindIII, la trousse commerciale pEasy-Uni Seamless Cloning and Assembly (TransGen) a été utilisée tel qu'indiqué par le manufacturier.

Le produit de réaction a été transformé par choc thermique chez des *E. coli* DH5 α sélectionné sur géloses contenant de la tétracycline à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Voir section 2.15). Le plasmide résultant a été nommé pXP1.

2.18 Construction de la souche K56-2 ::CTX-PrhIA-lux.

Le plasmide a été préparé par mini-prep à partir des transformants obtenus par la section 2.17 puis transformé par choc thermique dans *E. coli* SM10 (section 2.15).

Des précultures d'*E. coli* SM10 contenant le plasmide (donneur) et de *B. cenocepacia* K56-2 (receveur) ont été préparées en TSB et incubées pendant 16h à 37°C.

Cinq cents μL de chaque culture a été mélangé dans un microtube stérile.

Cent μL du mélange a été étalé sur quelques géloses et celles-ci ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Des témoins avec *E. coli* seule et *B. cenocepacia* seule sont également préparés.

Les mélanges ont été récupérés en grattant la gélose en surface à l'aide d'en embout de pipette stérile et repris dans 1 mL de milieu LB. Cent 100 μL a été étalé sur plusieurs géloses contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tétracycline ainsi que l'antibiotique de contre-sélection (polymixine B 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afin de tuer *E. coli*. Les géloses ont été incubées pendant 48 heures à 37°C.

2.19 Modification du plasmide pBBR5::FLP-Tc^R (Flippase)

Le plasmide pBBR5::FLP-Gen^R/Tc^R a été reçu sous forme de mini-prep de la part de l'équipe de Léo Eberl (Université de Zürich).

Une mini-prep du plasmide pFTP1 a été préparée.

Les amorces XPGibTpR_F et XPGibTpR_R ont été utilisées pour amplifier la cassette de résistance de la triméthoprine à partir du plasmide pFTP1 à l'aide de la polymérase Fast Pfu-Fly avec les conditions PCR de la Fast Pfu-Fly et une température de fusion 58°C pendant 40 sec (voir section 2.10)

La PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5% et purification sur gel.

Le plasmide pBBR5::FLP-Gen^R/Tc^R a été digéré par MluI et XhoI pour retrait de la cassette de résistance à la tétracycline. Le plasmide digéré a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5% et purification sur gel.

Le kit pEasy-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit (Trans) a été utilisé selon les recommandations du fabricant pour assembler le produit PCR et le plasmide.

Une transformation par choc thermique a été effectuée chez des cellules compétentes commerciales selon les recommandations du fabricant et ces cellules ont été étalées sur plusieurs géloses contenant 200 µg/mL de triméthoprimine et incubées 24 heures à 37°C. Les transformations ont été vérifiées par mini-prep et digestion par NcoI et BamHI pour confirmer la présence de la cassette de résistance dans le plasmide sans passer par PCR.

2.20 Retrait de la cassette de résistance de Mini-CTX-*lux* par Flippase

Le plasmide pBBR5::FLP-Gen^R/Tp^R a été transformé dans les souches d'*E.coli* donneuses S-17 et χ 7213. Le plasmide a ensuite été introduit dans la souche de *B. cenocepacia* K56-2 ::CTX-*PrhIA-lux* (ED4442) par conjugaison selon le protocole précédemment décrit (section 2.18).

Afin de vérifier si les souches étaient rendues sensibles à la tétracycline, les colonies d'intérêt ont été repiquées sur LB agar contenant 200 µg/mL de triméthoprimine et 15 µg/mL de polymyxine B et incubées pendant 24-48 heures à 30°C.

Un repiquage a été effectué en parallèle sur LB agar contenant 50 µg/mL de tétracycline puis sur géloses LB et laisser incubées 48 heures à 37°C.

Afin d'éliminer le plasmide codant pour la flippase, les colonies sensibles à la tétracycline ont été repiquées sur LB agar sans NaCl contenant du sucrose à une concentration de 10% et incubées 48 heures à 37°C. La sensibilité à la triméthoprimine a été confirmée en repiquant ces mêmes colonies sur LB agar contenant 200 µg/mL de triméthoprimine.

2.21 Quantification de l'expression du rapporteur *PrhIA-lux*

La luminescence du rapporteur a été mesurée dans les milieux suivants :

LB

NB

NB+0,5% dextrose

TSB

LB+0,5% dextrose

M9-CAA (Base M9 avec 0,4% dextrose et 0,5% acides casamino)

Trois clones de la souche rapportrice ainsi qu'un témoin contenant un *CTX-lux* sans promoteur ont été testés. Les milieux de culture ont étéensemencés à une dilution de 1 :100 à partir de précultures de nuit en milieu TSB sans lavage. La luminescence et la DO_{600} ont été mesurées à l'aide d'un appareil Cytation (Biotek) à 37°C avec une prise de mesure aux 30 minutes et après agitation de 30 secondes. Les mesures ont été prises sur 48 heures.

2.22 Optimisation du milieu pour l'activité du rapporteur

Un stock de M9 10X sans dextrose ni NH_4Cl a été préparé.

Différents stocks de sources de carbone et d'azote a été préparés selon les tableaux 2.1 et 2.2. La concentration de 27.8mM a été utilisée pour toutes les sources de carbone et équivaut à 0,5% de dextrose. Cela va de même pour le 10mM en source d'azote qui équivaut à la concentration utilisée dans le milieu M9.

Tableau #2.1 : Compilation des sources de carbone et de leurs masses pour préparer les solutions stock dans l'expérience des choix de sources de carbonés et d'azote.

Nom du produit	g/moles	Masse pour stock 10X de 10mL (g)
Dextrose (référence)	180,15588	0,100
Adonitol	152,1458	0,084
Citrate de sodium	258,069	0,143
Glycerol-3-phosphate	172,0737	0,096
D-Alanine	89,0932	0,049
D-Galactose	180,156	0,100
D-Fructose	180,16	0,100

D-Fructose-6-phosphate	259,81	0,144
D-Flucose-6-phosphate	260,136	0,144
Acide glucuronique	194,139	0,108
Acide malique	134,0874	0,074
Mannose	180,156	0,100
D-Mannitol	182,172	0,101
D-Psicose	180,156	0,100
D-Sorbitol	182,17	0,101
D-Ribose	150,13	0,083
Xylose	150,13	0,083
Acide fumarique	116,0722	0,064
Glycérol	92,09382	0,051
Hydroxyproline	131,13	0,073
L-Alanine	89,094	0,049
Alanine-Glycine	146,14	0,081
L-Arabinose	150,13	0,083
L-Fucose	164,16	0,091
D-Arabitol	152,14	0,084
L-Arginine	174,201	0,097
L-Asparagine	132,119	0,073
Acide aspartique	133,1	0,074
L-Cystéine	121,15	0,067
Acide glutamique	147,1293	0,082
Acide pyroglutamique	129,04	0,072

L-Glutamine	146,1445	0,081
L-Histidine	155,157	0,086
Acide lactique	90,0779	0,050
L-Phénylalanine	168,1891	0,093
Acide γ -Aminobutyrique	103,12	0,057
L-Proline	115,13	0,064
L-Sérine	105,0926	0,058
L-Thréonine	119,12	0,066
L-Inositol	180,16	0,100
Acide D-Mucique	210,1388	0,117
4-Hydroxyphénylacétate	152,15	0,084
Propionate de calcium	186,219	0,103
Acide pyruvique	88,06	0,049
Méthyl Pyruvate	102,09	0,057
Acide succinique	118,09	0,066
Xylitol	152,15	0,084
Désoxyribose	134,13	0,074
Acide citraconique	130,1	0,072
Glycine	75,07	0,042
L-Glycine-Proline	172,182	0,096
L-Lysine	148,18	0,082
Sodium-2-Oxobutyrate	124,07	0,069
Désoxyadénosine monophosphate	331,2218	0,184
Acide citramalique	148,11	0,082

Acide hydroxyphénylacétique	152,1473	0,084
Sucrose	342,3	0,190
Acide Bromo Succinique	196,98	0,109
D-Arabinose	150,13	0,083
Acide D-Galactonique- γ -Lactone	178,14	0,099
Acide D-Gluconique	194,1394	0,108
D-Glucosamine	179,17	0,099
Acide D-Glucosaminique	195,17	0,108
Méthyl Lactate	104,105	0,058
D-Tréhalose	342,296	0,190
Dulcitol	182,17	0,101
L-Alaninamide	88,11	0,049
L-Arabitol	152,14	0,084
L-Fucose	164,16	0,091
Mono Méthyl Succinate	132,11	0,073
Phényléthyl-amine	121,18	0,067
Acide quinique	192,17	0,107
Acide α -Ketoglutarique	146,11	0,081
Acide β -Hydroxybutyrique	104,1045	0,058
Acide α -hydroxybutyrique	104,1045	0,058
Acide sébacique	202,25	0,112
Acide malonique	104,0615	0,058
Acide propionique	74,08	0,041
Acide D-saccharique	210,1388	0,117

Acide <i>p</i> -hydroxyphenyl acétique	152,15	0,084
Acide tricarballoylique	176,12	0,098
Tween 20	1227,54	0,681
Tween 40	1283,63	0,713
Tween 80	1310	0,727
D-Tagatose	180,16	0,100
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	221,21	0,123
Acide acétique	60,052	0,033
Acide <i>cis</i> -aconitic	174,11	0,097
Acide formique	46,03	0,026
Acide D-galacturonique	194,1	0,108
Ethanolamine	61,08	0,034
D,L-carnitine	161,1989	0,089
3-butanediol	90,122	0,050
Urée	60,06	0,033
Acide α -ketovaleric	116,116	0,064

Tableau #2.2 : Compilation des sources d'azote et de leurs masses pour préparer les solutions stock dans l'expérience des choix de sources de carbones et d'azote.

Sources d'azote	g/moles	Masse pour stock de 50mL (g) 2X
Chlorure d'ammonium	53,491	0,053
ADN sperme saumon	N/A	0,100
Urée	60,06	0,060
Nitrate de sodium	62,0049	0,062
Nitrite de sodium	46,005	0,046
Thymine	126,1133	0,126
Adénine	135,13	0,135
Uracil	112,0868	0,112
Guanine	151,13	0,151
Cytosine	111,1	0,111
Arginine	174,2	0,174
Histidine	155,1546	0,155
Lysine	146,19	0,146
Acide aspartique	133,11	0,133
Acide glutamique	147,13	0,147
Sérine	105,09	0,105
Thréonine	119,1112	0,119
Asparagine	132,12	0,132
Glutamine	146,14	0,146
Cystéine	121,16	0,121
Glycine	75,07	0,075
Proline	115,13	0,115

Alanine	89,09	0,089
Valine	117,151	0,117
Isoleucine	131,17	0,131
Leucine	131,17	0,131
Méthionine	149,21	0,149
Phénylalanine	165,19	0,165
Tyrosine	181,19	0,181
Tryptophane	204,23	0,204

Chacune des sources de carbone a été testées dans 3 puits d'une plaque Honeycomb™ de 100 puits adapté au Bioscreen (avec NH₄Cl 10 mM comme source d'azote) pour observer la croissance.

La même chose a été faite avec les sources d'azote (avec 27.8 mM de dextrose comme source de carbone).

Les milieux de culture ont étéensemencés à une dilution de 1 :100 à partir de précultures de nuit en milieu TSB. La luminescence et la DO₆₀₀ ont été mesurées à l'aide d'un appareil Cytation (Biotek) à 37°C avec une prise de mesure aux 30 minutes et une agitation seulement avant les mesures. Les mesures ont été prises sur 48 heures.

2.23 Quantification de l'expression du rapporteur *PrhIA-lux* sur quelques milieux sélectionnés

Pour donner suite aux résultats de l'expérience 2.22, 4 sources d'azote et 16 sources de carbone ont été sélectionnées pour des essais de combinaisons. La croissance de K56-2 a été testée sur chacune des sources de carbone avec chacune des sources d'azote en triplicata avec le Bioscreen, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Ensuite, 24 combinaisons carbone/azote ont été choisies pour analyses de l'activité du rapporteur *PrhIA-lux* au Cytation dans les mêmes conditions de culture, mais en mesurant la luminescence (expression du rapporteur) et la DO₆₀₀ (croissance).

Enfin, les milieux ont été réduits à six selon les résultats obtenus au Cytation. Ces six milieux ont été testés en flacons Erlenmeyer et contenaient 180mL d'eau d'osmose inverse et 20mL de M9 10X sans azote ni dextrose (M9 10X ajouté après autoclave) additionné avec les sources d'azote et carbone indiquées ci-dessous. Les sources de carbone/azote étaient présentes en équivalence de 0,5% de dextrose.

- 1) 0,667g urée + 2g dextrose
- 2) 0,667g urée + 2g galactose
- 3) 0,667g urée + 1g pyruvate
- 4) 1,278g proline + 1,456g leucine (agitation forte et prolongée requise)
- 5) 1,278g proline + 1,623g lysine
- 6) 1,467g NH_4SO_4 + 2g dextrose + 2g CAA

2.24 Essai de production en milieu BSM Proline-Leucine

Dans un Erlenmeyer de 2L, 750 mL du milieu BSM Pro-Leu a été préparé tel que décrit dans la section 2.3

Une pré-culture a été lancée en milieu BSM Pro-Leu pour chaque culture désirée pour les souches *B. cenocepacia* K56-2 et *B. cenocepacia* K56 *rhIA*-.

Un tube de pré-culture de 5 mL a été transvidé pour chacune des cultures désirées et les cultures ont été incubées en phase stationnaire à 37°C pendant 96h.

2.25 Extraction optimisée du biosurfactant en milieu BSM Proline-Leucine

Chacune des cultures en bouteilles de 2 L a été transvidée avant d'y ajouter 500 mL de chloroforme pour une culture de *rhIA*- et une souche sauvage. 500 mL d'acétate d'éthyle a été ajouté pour une culture du mutant *rhIA*- et une souche sauvage (cultures produites à la section 2.24) et les 4 bouteilles ont été incubés pour la nuit à 4°C.

Les mélanges ont été centrifugés à environ 6000 x *g* pendant 15 minutes ou à la vitesse maximale possible (selon la centrifugeuse) pour mettre en culot les bactéries puis le surnageant a été filtré à travers du sable et du coton et les extractions ont été effectuées avec le solvant correspondant (une à 500 mL et deux à 300 mL). Le solvant des extractions a été évaporé au Rotavap. Pendant les évaporations, 4 ballons de 50 mL ont été préparés pour y transférer les extraits évaporés avec le minimum de volume de solvant possible. Afin d'éliminer l'eau, 10 mL de toluène a été ajouté et

éaporé à 3 reprises au Rotavap. Finalement, les extraits ont été séchés pendant une nuit sous vide pour finaliser le retrait de l'eau.

Ensuite, les extraits ont été repris dans 50 mL de chloroforme et la présence du surfactant a été confirmé à l'aide du test de vaporisation d'huile sur gélose (Section 2.6). Chaque disque a été imbibé de 300 μ L d'extrait, en déposant 20 μ L à la fois. Les disques devaient être secs avant le dépôt d'un nouveau volume. 300 μ L de chloroforme a été utilisé comme témoin négatif. Les extraits ont été laissés à température pièce pour être diffusés pendant 5 h avant la vaporisation.

2.26 Chromatographie sur couche mince des extractions (TLC)

Une petite plaque de silice a été coupée et les identifications ont été faites au crayon à la mine (les coins en contact avec le solvant ont aussi été coupés). L'extrait à faire migrer a été resuspendu dans un petit fond de son solvant d'extraction. Les extraits ont été déposés à l'aide d'un capillaire sur la plaque de silice (la quantité a varié selon l'extraction). Un pot (Masson), dans lequel on met un papier filtre et un fond de solvant qu'on laisse reposer environ 15 minutes pour saturer l'air du pot en solvant, a été préparé. La plaque a été déposée dans le pot sans que le solvant touche aux dépôts. Finalement, le solvant a migré sans qu'il atteigne le haut de la plaque.

Utiliser l'un des révélateurs suivants :

Orcinol : Tremper la plaque et chauffer. Observer, destructeur et non réversible

Ninhydrine : Tremper la plaque et chauffer. Observer, destructeur et non réversible

Iodine : Déposer la plaque dans un pot, agiter fortement avec la poudre, observer (réversible si on laisse la plaque à l'air pour décolorer)

UV : Lampe UV dans une boîte noire.

CAM : Tremper la plaque et chauffer. Observer, destructeur et non réversible

2.27 Essais de biofilms sur K56-2 et son mutant *rhIA*- dans différents milieux

Pour cette manipulation, il faut utiliser des petits tubes de polystyrène de 5 mL stériles avec bouchon. Les précultures sont lancées à partir du stock à -80°C et ne sont pas lavées avant ensemencement.

Jour 1

Pour chaque condition, il faut idéalement préparer 5 à 10 tubes pour chaque souche, soit *B. cenocepacia* K56-2 et *B. cenocepacia* K56-2 *rhIA*- avec les milieux BSM Proline-Leucine et TSB. Les précultures ont été diluées 1 : 100 dans 2 mL de milieu par tube et par la suite incubées 72 heures à 37°C en phase stationnaire.

Jour 4

Après 72 heures d'incubation, il faut tout d'abord observer et noter la formation ou l'absence d'une pellicule de surface dans les conditions utilisées. Pour mesurer les biofilms, on retire par inversion le milieu de culture et on rince délicatement 2 fois avec 3 mL d'eau d'osmose inverse. Par la suite, on ajoute 3 mL de cristal violet 0,1% on laisse incubé 10 minutes à température pièce. Après incubation, on retire par inversion le cristal violet et on rince délicatement 2 ou 3 fois avec 3 mL d'eau d'osmose inverse. On dissout ensuite le cristal violet en ajoutant 3 mL d'acide acétique 33% dans les tubes et on mélange par vortex. Finalement, 200 µL sont prélevés de chaque tube et déposés dans une plaque à 96 puits pour une mesure de densité optique à 590 nm au lecteur de plaque multimode Cytation (Biotek).

Chapitre 3: Résultats

3.1 Courbes de croissance de différents mutants de *B. cenocepacia* K56-2

Le projet de maîtrise consistait à étudier et identifier le biosurfactant inconnu, mais tout d'abord, il fallait étudier l'expression et sa production via différentes méthodes dont un rapporteur *lux*.

Initialement, il était important de déterminer si la souche prototype *B. cenocepacia* K56-2 et ses mutants du *quorum sensing* et de *rhlA*- présentaient des différences de croissance dans les milieux de culture utilisés au cours de ce projet. Les figures 3.1, 3.2 et 3.3 montrent que les mutants ne croissent pas tous nécessairement comme la souche sauvage dans les différents milieux de culture.

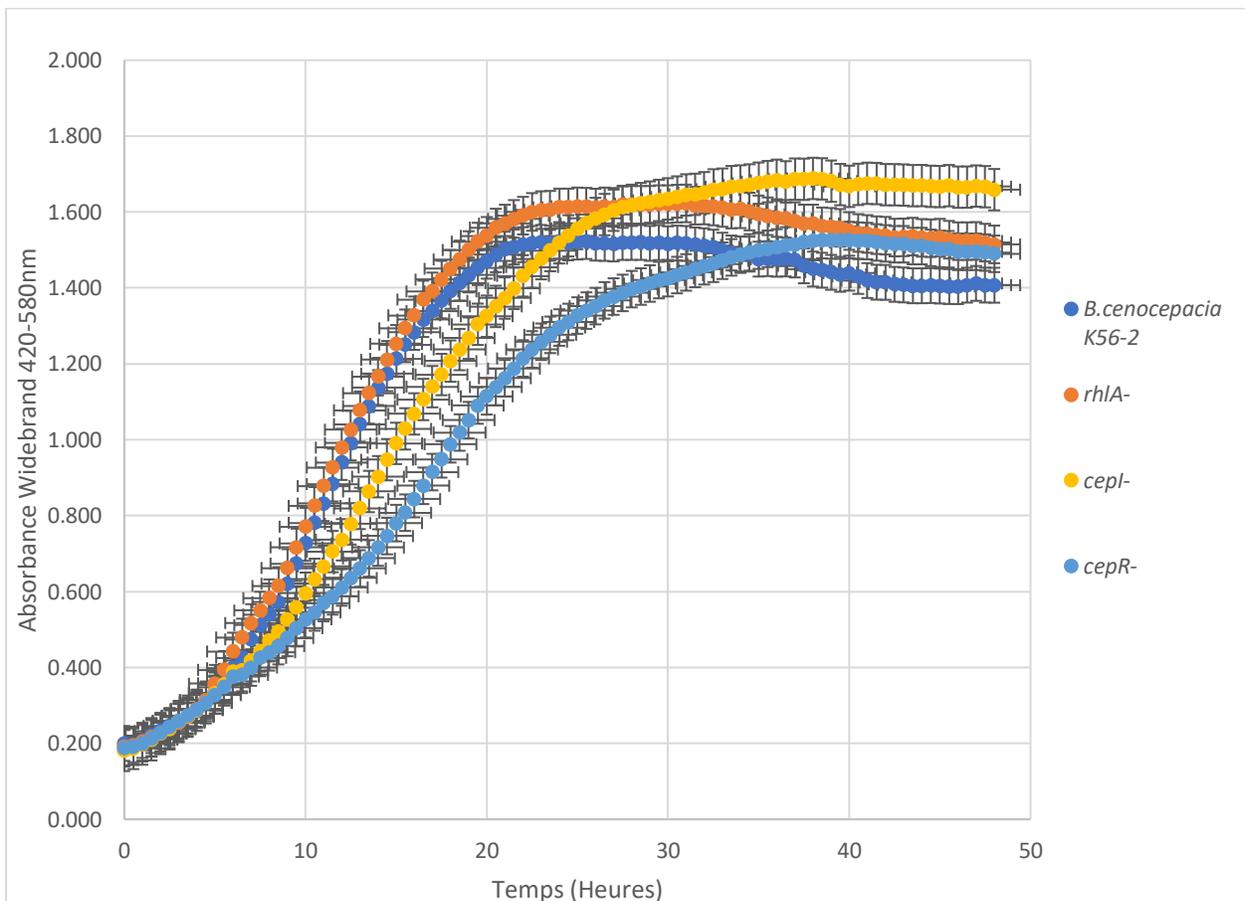


Figure 3.1 : Croissance de différents mutants de *B. cenocepacia* K56-2 en milieu TSB à 37°C en Bioscreen pendant 48h avec agitation avant chaque mesure à 30 minutes d'intervalle. L'expérience a été faite qu'une fois avec 5 réplicas par souche.

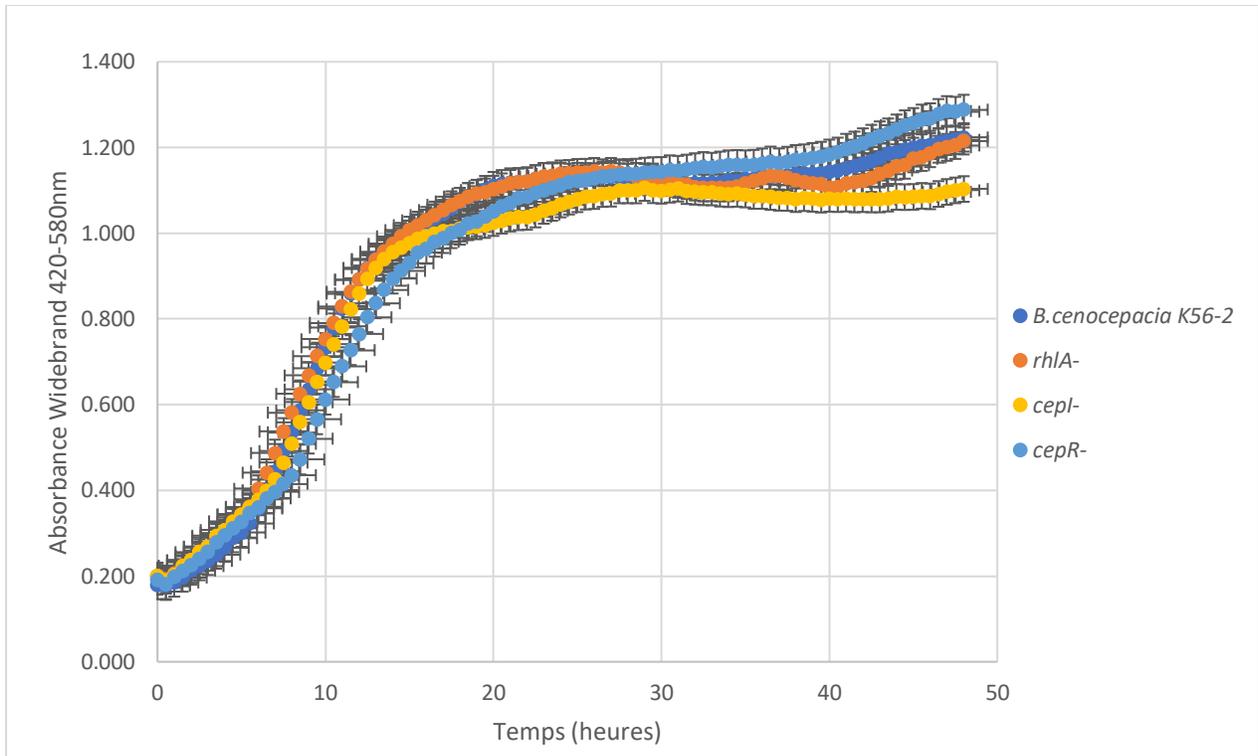


Figure 3.2: Croissance de différents mutants de *B. cenocepacia* K56-2 en milieu NB+0,5% dextrose à 37°C en Bioscreen pendant 48h avec agitation avant chaque mesure à 30 minutes d'intervalle. L'expérience a été fait qu'une fois avec 5 répliques par souche.

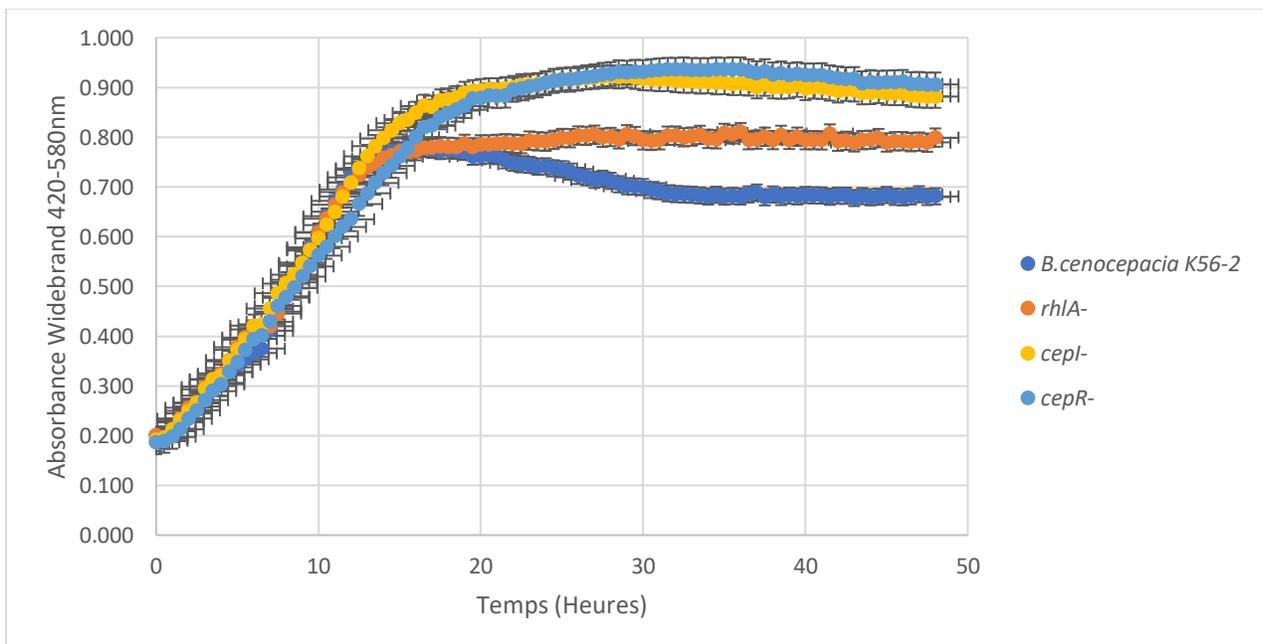


Figure 3.3: Croissance de différents mutants de *B. cenocepacia* K56-2 en milieu NB dextrose à 37°C en Bioscreen pendant 48h avec agitation avant chaque mesure à 30 minutes d'intervalle. L'expérience a été fait qu'une fois avec 5 répliques par souche.

3.2 Détermination de concentrations minimales inhibitrices de différents antibiotiques envers *B. cenocepacia* K56-2 et quelques souches d'*E. coli*.

Cette expérience a été faite, car il n'y avait pas beaucoup d'informations sur les CMI de *B. cenocepacia* K56-2 dans la littérature comparativement à des souches comme J2315 et H111. Or cette information serait utile pour la suite des travaux. Cette expérience avait comme objectif de confirmer les CMI dans nos conditions expérimentales. J'ai aussi confirmé des CMI chez nos *E.coli* donneuses, car j'avais noté une résistance élevée de SM10 à la triméthoprimine.

Tableau 3.1 : Concentrations minimales inhibitrices de quelques antibiotiques envers *B. cenocepacia* K56-2

Antibiotique	Concentration minimale inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Tétracycline	50
Glyphosate	>1%
Kanamycine	1600
Carbénicilline	>2000
Pénicilline G	>2000
Zéocine	>2000
Néomycine	>2000
Triméthoprimine	100
Chloramphénicol	75
Gentamycine	>2000
Polymyxine B	>1000

Tableau 3.2 : Concentrations minimales inhibitrices de quelques antibiotiques envers certaines souches de *E. coli*

Antibiotique	S17-1 (µg/mL)	SM10 (µg/mL)	Concentration pour χ7213 (µg/mL)
Gentamycine	30	30	30
Tétracycline	15	15	15
Triméthoprim	100	>1000	100

3.3 Essais de production sur géloses sang

Un des défis de ce projet était d'identifier des tests permettant de détecter et quantifier le biosurfactant hypothétique produit par K56-2. Or, les surfactants peuvent présenter une activité hémolytique (Tremblay et al. 2007). Le but était de tester si la mutation *rhlA*- affectait l'hémolyse. Le test fut qualitatif et non quantitatif avec pour seul objectif de déterminer si notre surfactant présentait une différence dans l'hémolyse (α pour partielle, β pour complète ou γ pour aucune hémolyse). *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* ont servi de témoins d'hémolyse. *Burkholderia cenocepacia* K56-2 a eu besoin de 48h pour avant de présenter une bonne croissance et suffisamment d'hémolyse pour un résultat (Tableau 3.6). Quatre milieux de compositions différentes, dont certains incluant du sang de mouton ou de cheval, ont été utilisés, mais ils ont tous donné le même résultat. Il y a donc qu'une seule colonne d'hémolyse dans le tableau pour simplifier la lecture des résultats. L'expérience a été faite en duplicata.

Tableau 3.3 : Type d'hémolyse observée selon la souche utilisée sur les 4 milieux sang

Bactérie	Type d'hémolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	β
<i>Enterococcus faecalis</i> ATC29212	γ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	α
<i>Pseudomonas aeruginosa rhIA-</i>	γ
<i>Burkholderia cenocepacia</i> K56-2	α
<i>Burkholderia cenocepacia</i> K56-2 <i>rhIA-</i>	γ

γ: aucune hémolyse, α: hémolyse partielle, β: hémolyse complète

3.4 Essais de production du surfactant par croissance sur gélose permettant la motilité *swarming*

Puisqu'il y avait une différence dans l'hémolyse du sang pour K56-2 WT et *rhIA-*, cela suggérait que le biosurfactant hypothétique est produit dans ses conditions. J'ai donc voulu tester le phénotype *swarming* dans différents milieux tel que présenté dans le tableau suivant. Le milieu NB avec dextrose a servi de point de comparaison avec les autres milieux, car il avait permis de révéler le défaut de *swarming* du mutant *rhIA-*. Ces essais ont révélé que les milieux gélosés n'étaient pas un bon point de départ pour déterminer l'expression de notre biosurfactant par *swarming* puisque les essais de vaporisation au Sudan IV étaient non-concluants.

Tableau 3.4 : Essai de *swarming* sur différents milieux

Milieux	K56-2 WT	K56-2 <i>rhlA</i> -
Milieu sang	Non-mobile	Non-mobile
Milieu sang + dextrose	Non-mobile	Non-mobile
NB	<i>Swarming</i> faible, similaire à mutant <i>rhlA</i> -	<i>Swarming</i> faible
NB + dextrose	<i>Swarming</i> sur 3/4 de la gélose	<i>Swarming</i> faible
ASM	Présence de <i>swimming</i> , trop mou	Présence de <i>swimming</i> , trop mou
ASM + dextrose	Présence de <i>swimming</i> , trop mou	Présence de <i>swimming</i> , trop mou
NB + dextrose + sang	Mobilité très faible	Mobilité très faible
NB + sang	Non-Mobile	Non-Mobile

3.5 Cinétiques de luminescence avec construction propre

Tel que mentionné dans l'introduction, le biosurfactant hypothétique n'a pas pu être identifié. Les quelques essais pour varier le milieu de culture afin de favoriser une meilleure croissance n'étaient pas prometteurs non plus. La stratégie choisie fut donc de développer un rapporteur transcriptionnel pouvant nous informer sur l'expression de l'opéron *rhl*, qui pourrait être utile afin d'identifier les facteurs influençant la production de ce biosurfactant. Brièvement, le rapporteur fut construit chez une souche d'*E. coli* puis transféré chez *B. cenocepacia* K56-2 WT avant d'en retirer les résistances pour que la construction soit propre. Les deux graphiques qui suivent présentent les deux premières cinétiques, après optimisation, de la construction propre de Mini-CTX-*lux* avec le promoteur *rhlABC*. J'ai commencé avec des milieux de base que l'on avait au laboratoire et je voulais aussi tester l'effet du dextrose en parallèle. Il faut considérer comme indépendant de l'autre en raison des ajustements de l'appareil, mais l'importance est que la tendance reste la même entre les deux graphiques (figure 3.4 et 3.5). Il a été possible de constater que le milieu M9 avec CAA et dextrose était un meilleur milieu pour l'expression de notre biosurfactant.

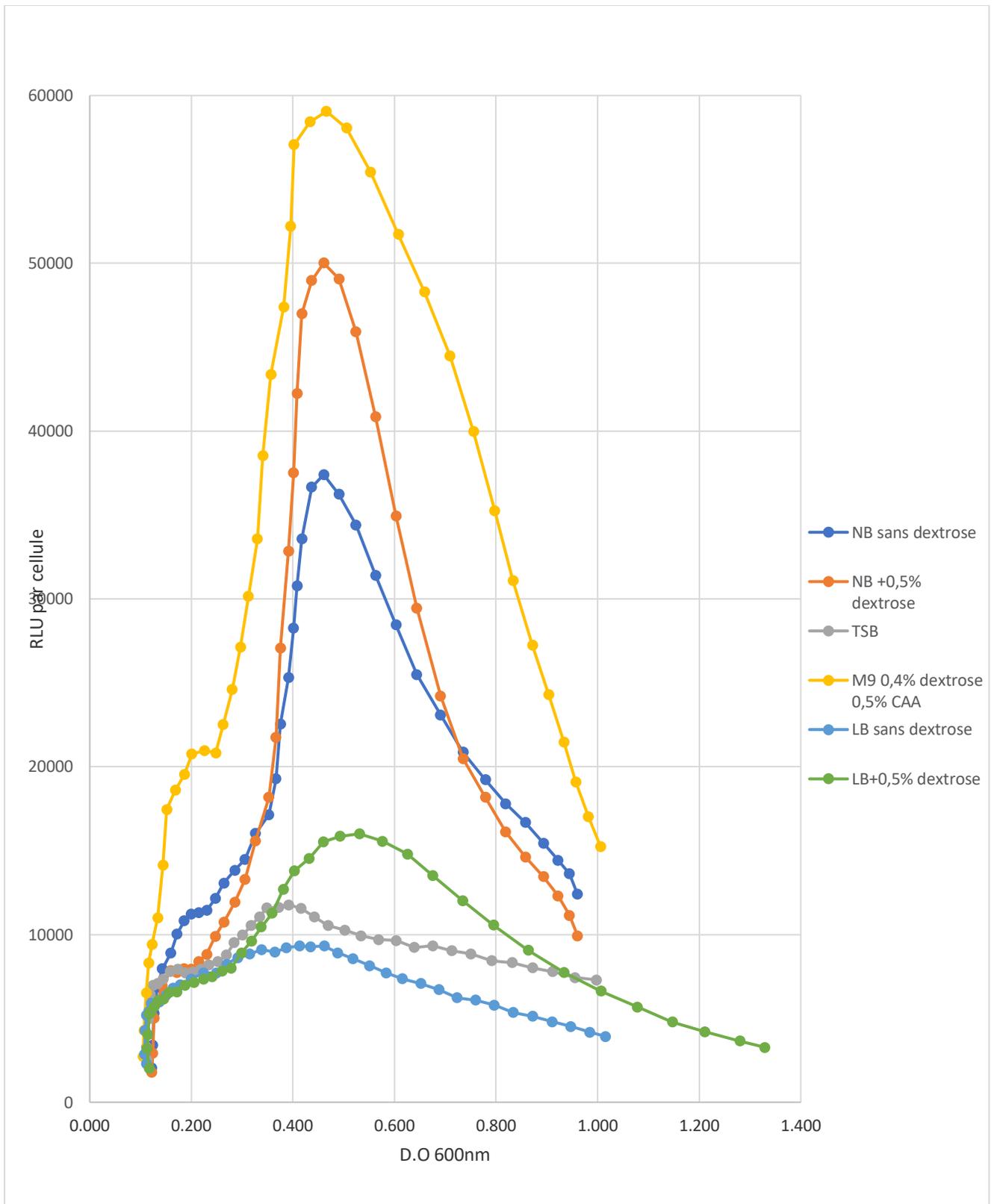


Figure 3.4 : Activité du rapporteur transcriptionnel *rhIA-lux* en fonction de la croissance de *B. cenocepacia* K56-2 dans différents milieux, premier essai. RLU représente l'unité de lumière relative.

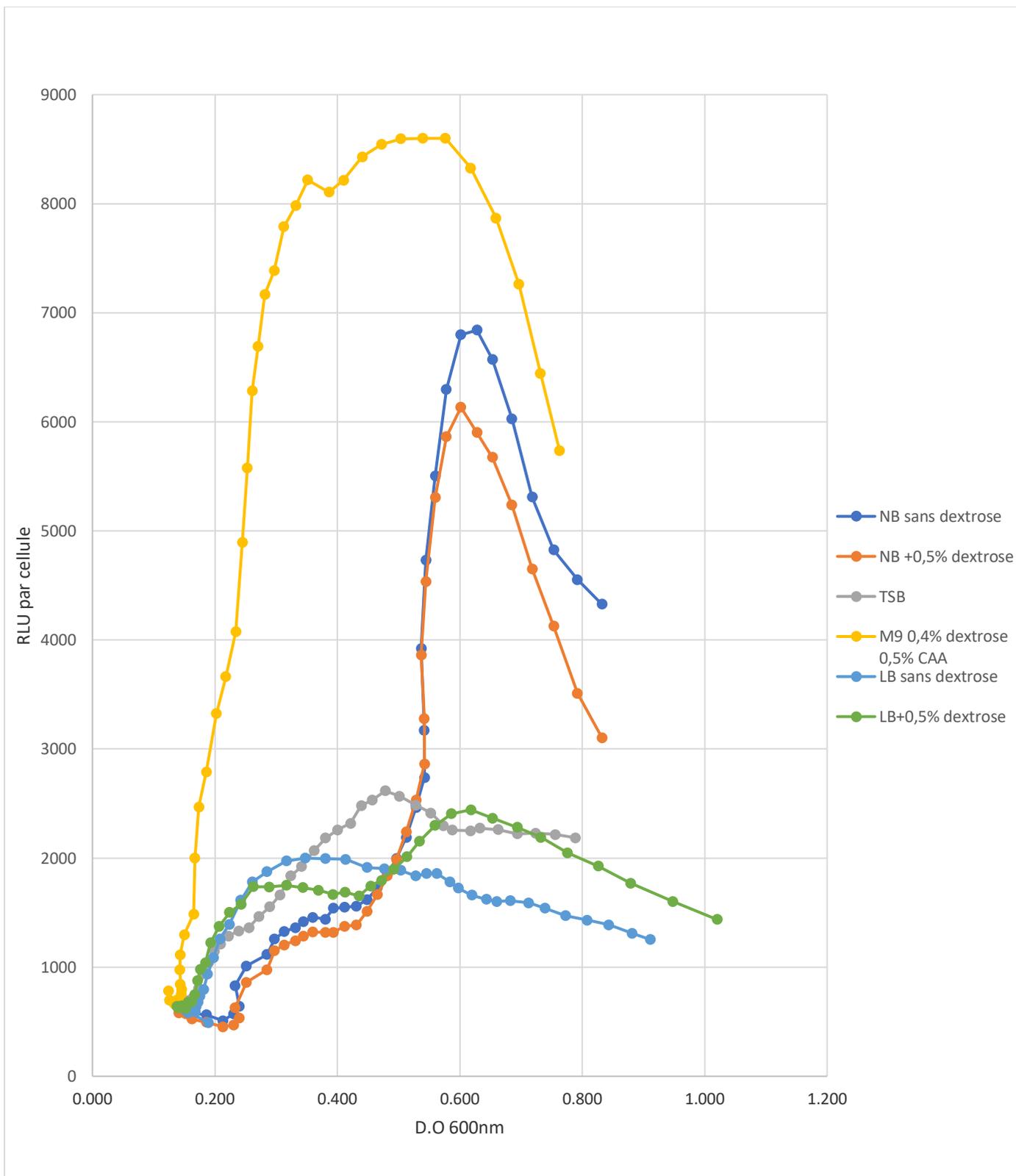


Figure 3.5 : Activité du rapporteur transcriptionnel *rhlA-lux* en fonction de la croissance de *B. cenocepacia* K56-2 dans différents milieux, deuxième essai. RLU représente l'unité de lumière relative.

3.6 Sélection de différentes sources de carbones et d'azotes en base M9 pour optimisation du milieu de production du biosurfactant

Considérant les données obtenues aux figures précédentes, le milieu minéral M9 semblait une bonne base pour investiguer l'influence des différents éléments composant le milieu de culture. Nous avons d'abord commencé par tester différentes sources de carbone et d'azote pour simplement vérifier la croissance. En effet, certaines données sur les sources assimilables par la souche J2315 de *B. cenocepacia* étaient disponibles (analyses Biolog) mais les souches peuvent être très différentes entre elles.

Ensuite, nous avons choisi quatre sources d'azote (histidine, urée, nitrite et proline) pour les combiner avec les différentes sources de carbone ayant permis de la croissance.

Nous avons ensuite choisi certaines combinaisons pour faire des expériences de luminescence avec le rapporteur *rhIA-lux* en croissance dans le lecteur de plaques Cytation. Le graphique suivant représente l'un des résultats obtenus au cours de cette dernière expérience.

Ces nombreuses expériences ont révélé que les sources de carbone et d'azote influencent grandement l'expression de notre biosurfactant et que certaines sources apparaissent clairement favorables pour l'expression du rapporteur.

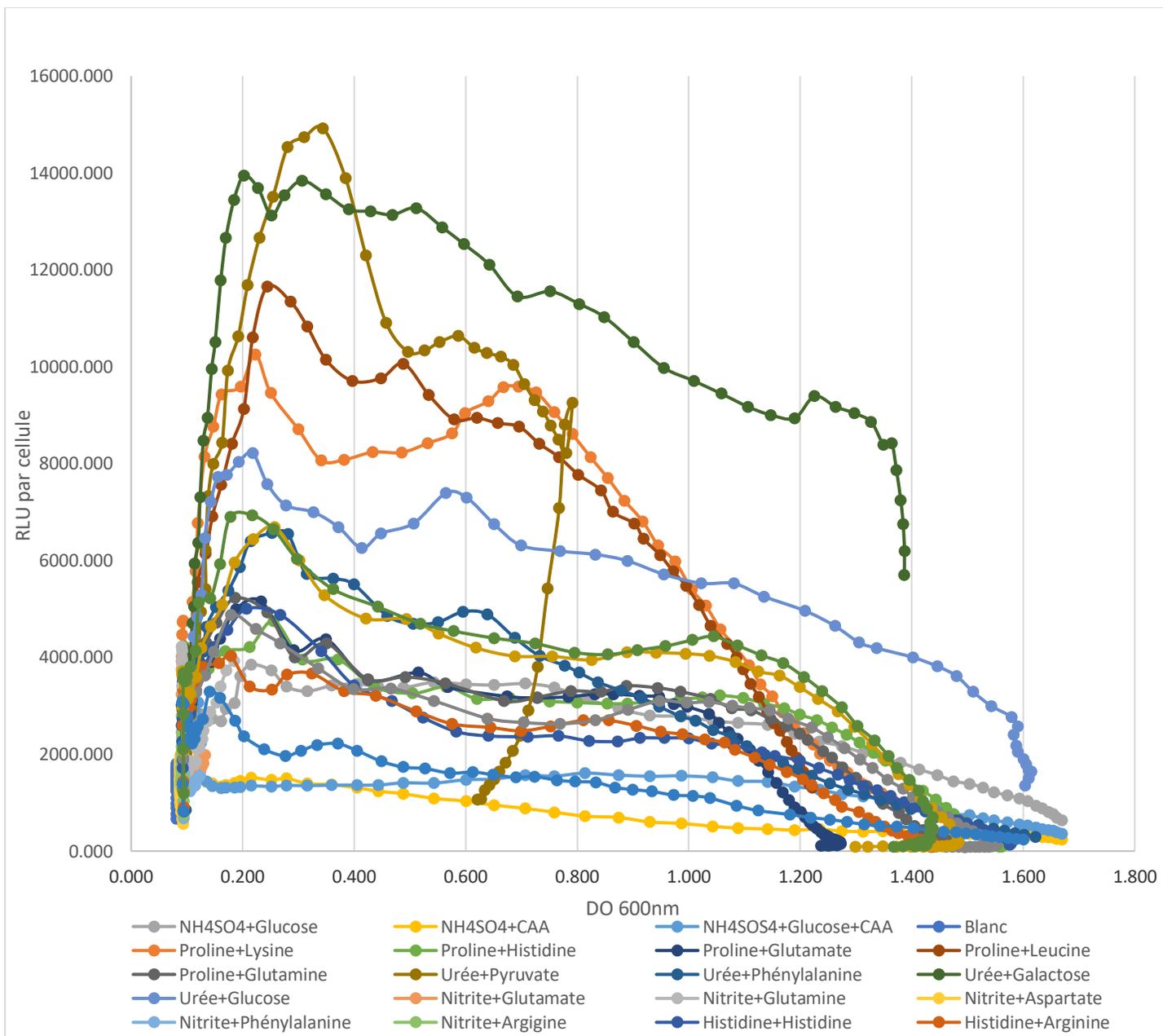


Figure 3.6 : Activité du rapporteur transcriptionnel *rhlA-lux* en fonction de la croissance de *B. cenocepacia* K56-2 dans différents milieux. RLU représente l'unité de lumière relative.

3.7 Essais d'expression sur quelques milieux sélectionnés

Les résultats obtenus lors des expériences de combinaisons de diverses sources de carbone et d'azote ont permis de choisir six milieux pour des tests en tubes. En effet, les essais précédents avaient tous été effectués en plaque 96 puits avec des volumes de 200 μ L, une condition avec faible agitation et donc peu optimale en oxygène.

La figure 3.7 présente un essai de cinétique en tube avec 5 mL de différents milieux. Malheureusement, cette cinétique est très lente initialement alors il n'y a pas de données avant 12 h de croissance. Malgré le faible nombre de points d'échantillonnage, cette figure permet d'observer des différences majeures entre les différents milieux de culture. On note que toutes les combinaisons sont nettement plus efficaces pour activer la transcription de l'opéron rhl que notre milieu de référence NB+dextrose. De plus, la proline semble une source d'azote particulièrement prometteuse.

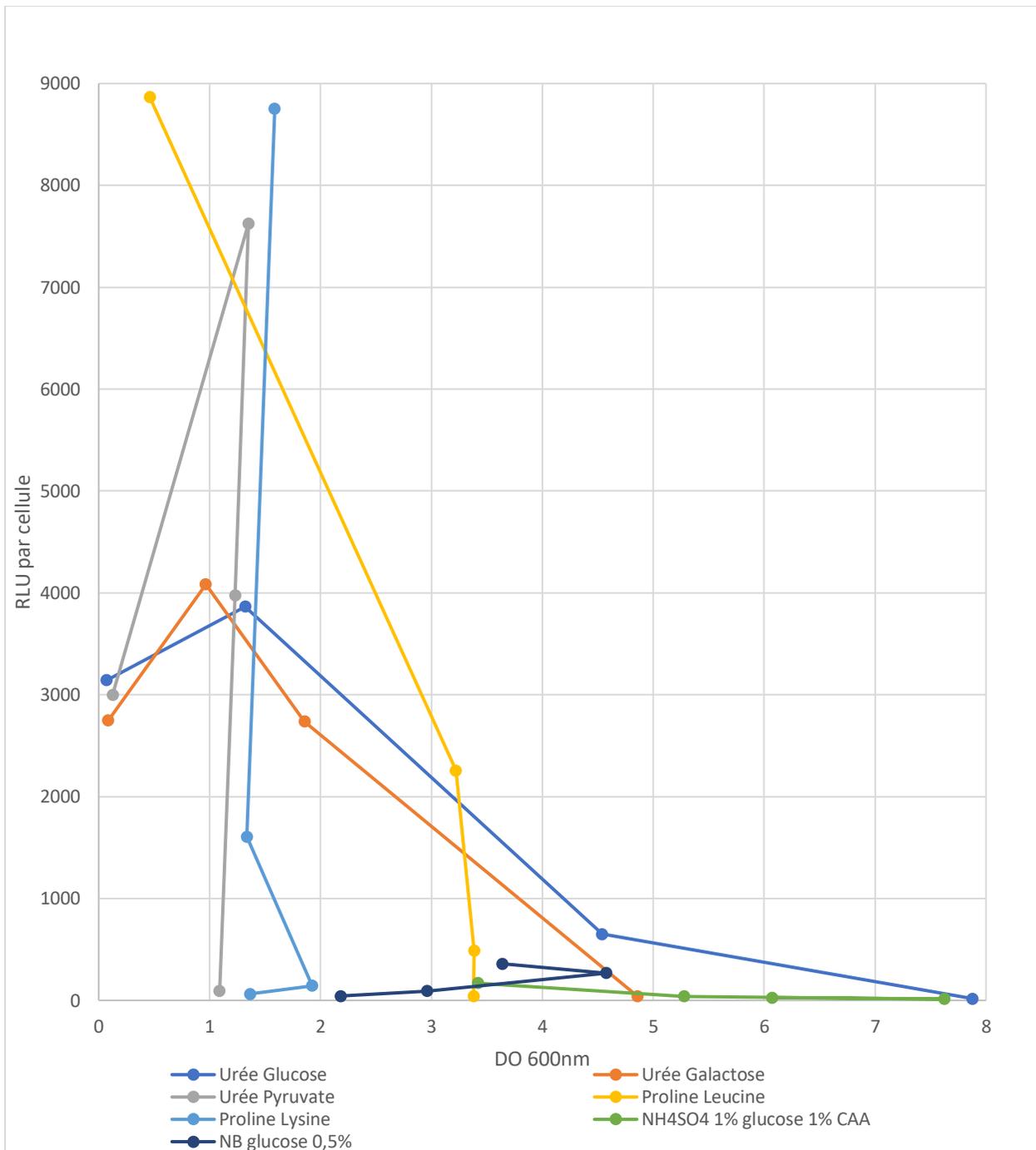


Figure 3.7 : Activité du rapporteur transcriptionnel *rhlA-lux* en fonction de la croissance de *B. cenocepacia* K56-2 dans différents milieux en tube de 5mL. RLU représente l'unité de lumière relative.

3.8 Expression du biosurfactant et comparaison d'une base minérale M9 et BSM

Les résultats précédents suggéraient que le milieu minéral M9 avec proline et leucine constituait un bon compromis entre croissance et transcription de l'opéron.

La source d'azote et de carbone ayant été optimisée, il était alors intéressant d'explorer la possibilité que la base M9 n'était pas idéale pour activer la production du biosurfactant hypothétique. Une revue de la littérature a permis d'identifier une base minérale nommée BSM qui permettrait une meilleure survie et un meilleur soutien pour la bactérie après la phase exponentielle de croissance (données supplémentaires de Sass, et al. 2013).

La figure 3.8 représente la différence de transcription du promoteur de l'opéron *rhIABC* en changeant la base minérale M9 pour une base minérale BSM tout en gardant la proline et la leucine comme source principale de carbone et d'azote. Le milieu TSB est présent comme témoin négatif d'un milieu qui ne produit normalement pas le biosurfactant recherché. Ces résultats suggéraient que passer à la base BSM est intéressant, car l'activité du rapporteur est légèrement plus forte que dans le M9, mais surtout maintenue sur une plus longue période, soutenant la croissance à une plus forte densité cellulaire, des facteurs positifs pour accroître la production du biosurfactant étaient donc présents dans cette base minérale BSM sans à avoir à changer la source de carbone et d'azote (figure 3.8).

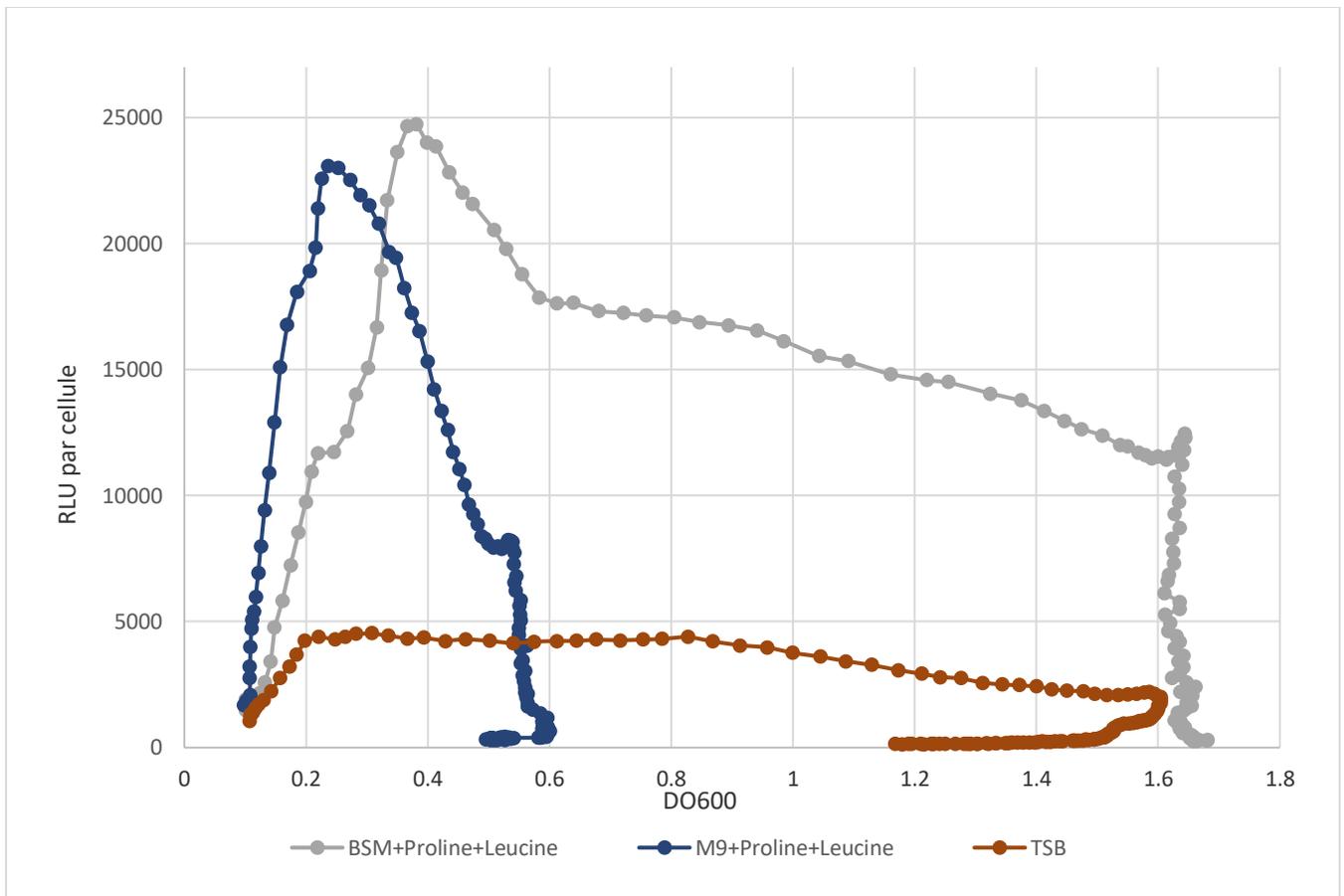


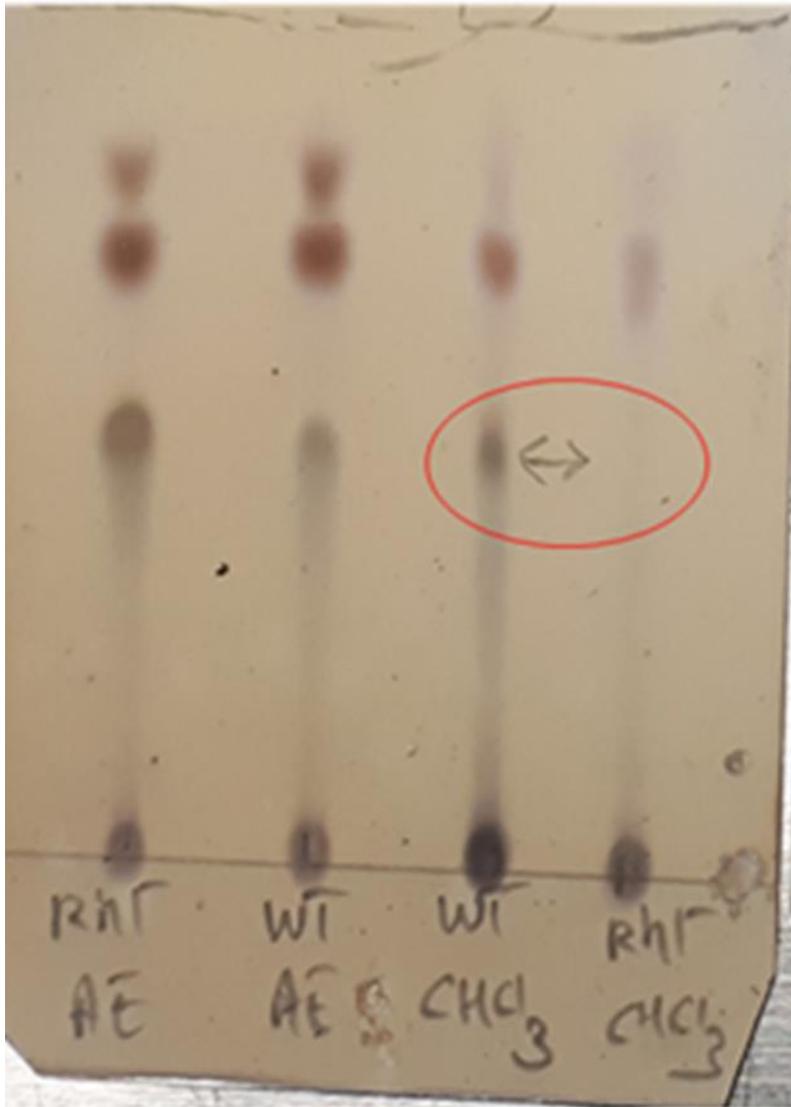
Figure 3.8 : Comparaison dans l'activité du rapporteur en fonction de la croissance de *B. cenocepacia* K56-2 entre deux bases minérales pour le milieu de culture. RLU représente l'unité de lumière relative.

3.9 Chromatographie sur couche mince des extractions et révélations (TLC)

Afin de détecter le biosurfactant hypothétique, plusieurs conditions de TLC ont été testées en cours de projet ainsi que de multiples extractions. Ces essais ont été effectués avec l'aide de l'agente de recherche Marianne Piochon. Ici je présente la seule condition de TLC ayant réussi à révéler une tache présente dans la souche WT mais absente chez la souche *rhlA*⁻. Cette tache fut révélée avec de l'orcinoï, un agent révélateur de glycolipides qui réagit sur la liaison ester entre le sucre et le lipide. Les extraits proviennent d'une extraction Eau-Méthanol-Acétate d'éthyle et Eau-Méthanol-Chloroforme en ratio 1 :1 :1. Ces résultats étaient très encourageants, car c'était une indication visuelle que le biosurfactant est extractible et détectable.

3:7 (Hexanes, AE)-Orcinol

→ Ratio du solvant d'extraction



rhIA- en
acétate
d'éthyle

WT en
acétate
d'éthyle

WT en
chloroforme

rhIA- en
chloroforme

Figure 3.9 : Révélation à l'orcinol de deux extraits de *B. cenocepacia* WT et 2 extraits de son mutant *rhIA-* dans un solvant de migration de ratio 3:7 (Hexanes : Acétate d'éthyle)

3.10 Essais de biofilms sur K56-2 et son mutant *rhIA*- dans différents milieux et observation du phénotype pellicule

Un défaut de pellicule de surface majeur a été observé en culture statique sur 72 heures à 37°C entre le mutant *rhIA*- et la souche WT. Ce défaut consiste en l'absence quasi-complète de la pellicule de surface. Une pellicule est une forme de biofilm qui se forme à la surface d'un liquide, ce qui est un phénotype différent d'un biofilm pouvant se former sur une paroi ou une surface. J'ai donc effectué un essai de formation de biofilm sur les parois de tubes pour voir si cette forme de biofilm était aussi affectée par le défaut du mutant *rhIA*-. Les deux photos qui suivent le graphique (Figures 3.11 et 3.12) présentent l'absence et la présence de pellicule de biofilm dans les deux milieux de production du biofilm chez la souche *rhIA*- et WT (première rangée de la photo).

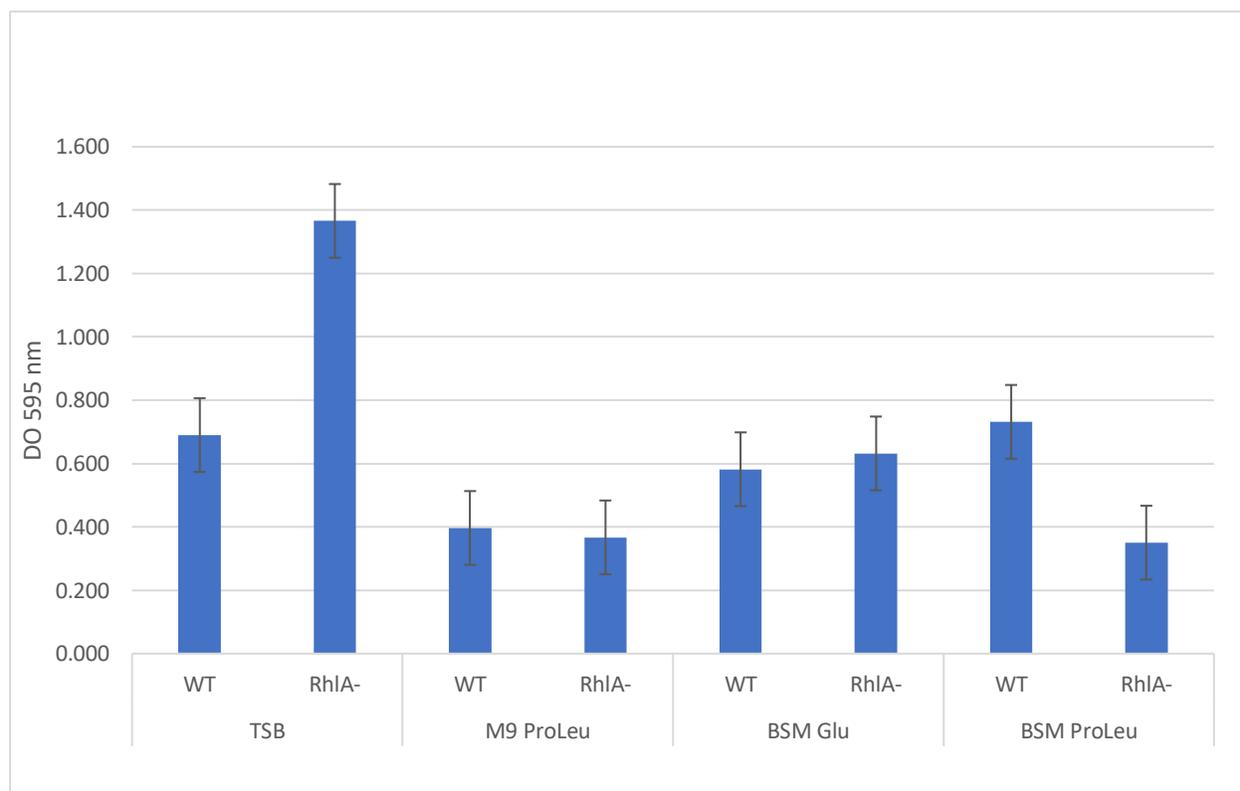


Figure 3.10 : Mesure de la formation de biofilms de *B. cenocepacia* K56-2 et de son mutant *rhIA*- dans différents milieux à 37°C après 72 heures en culture statique de 2mL en tube de polystyrène par coloration au cristal violet et mesure de l'absorbance.

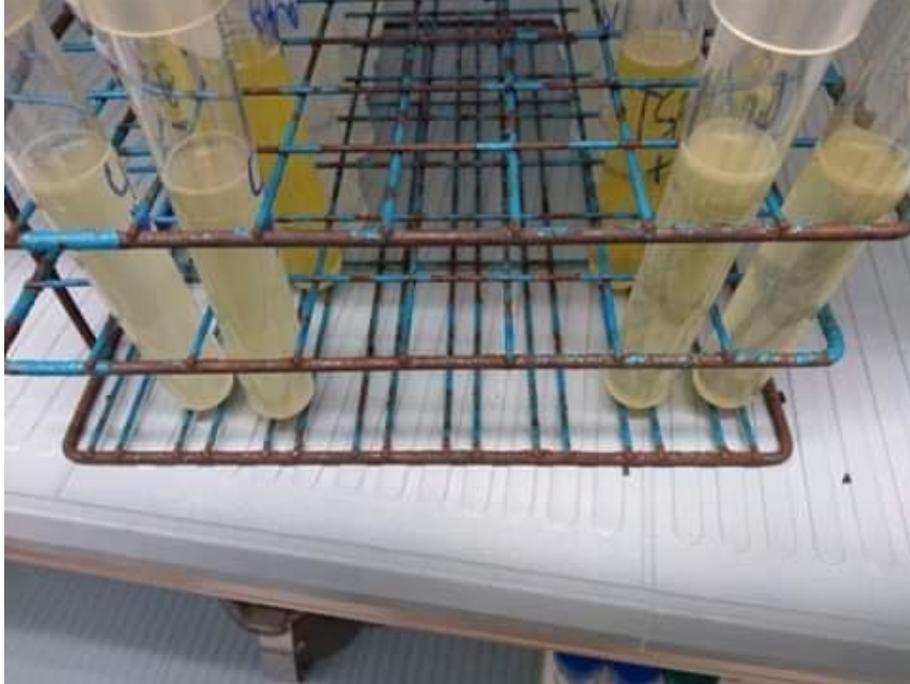


Figure 3.11 : Observation du phénotype pellicule en milieu BSM Proline Leucine chez le mutant *rhIA-* (gauche) et WT (droite) de *B. cenocepacia* K56-2



Figure 3.12 : Observation du phénotype pellicule en milieu TSB chez le mutant *rhIA-* (gauche) et WT (droite) de *B. cenocepacia* K56-2

Chapitre 4: Discussion

4.1 CMI et courbes de croissances des différents mutants de *B. cenocepacia* K56-2

Tout d'abord, comme le clonage posait plusieurs problèmes, j'ai décidé de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de plusieurs antibiotiques envers *B. cenocepacia* K56-2 et *E.coli* pour s'assurer que tout soit fonctionnel. De plus, même si nous avons déjà plusieurs informations préliminaires, différentes souches de *B. cenocepacia* peuvent avoir différentes résistances. Par exemple, la souche de *B. cenocepacia* LMG18829 est totalement résistante à la tétracycline selon des expériences que j'avais faites en parallèle alors que la tétracycline est l'antibiotique utilisé le plus couramment avec cette espèce au laboratoire. Comme présenté au tableau 3.1, la souche K56-2 est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et les résultats semblent cohérents avec la littérature. C'est-à-dire qu'elle est sensible au triméthoprime, la tétracycline et le chloramphénicol. Néanmoins, il y a toujours 2-3 colonies qui apparaissent sur chloramphénicol, peu importe la concentration utilisée. Cela indique que cet antibiotique ne devrait pas être utilisé en premier lieu dû à l'apparition de mutants spontanés pouvant rendre le clonage plus complexe ou retirer la pression qu'avait la bactérie pour garder un plasmide avec cette résistance. Ce problème ne fut pas rencontré avec la triméthoprime et la tétracycline. De plus, même si cette bactérie croît bien en O/N à 37°C, elle prend 48h pour croître avec un antibiotique sur gélose si elle possède la résistance, qu'elle soit naturelle ou acquise par un plasmide. Quant à la kanamycine, même si elle est techniquement totalement résistante à cet antibiotique, j'ai découvert que notre souche K56-2 avait tout de même un avantage à conserver un plasmide avec cette résistance. Alors que la souche sauvage prend 72h à croître sur gélose et 48h en liquide avec 1600 mg/L, une souche avec un plasmide de résistance prendra que 24h en milieu liquide et 48h sur gélose à la même concentration. Ce qui permet d'ouvrir certaines portes envers des plasmides à utilisation particulière sans nécessairement à avoir à changer la cassette de résistance constamment. Le tout aura été surtout fait pour éliminer tous les problèmes possibles durant les manipulations de plasmides effectuées durant ce projet, mais aura permis de confirmer les phénotypes de résistance de notre souche face aux différents antibiotiques disponibles dans notre laboratoire.

Pour *E. coli*, voir tableau 3.2 pour les résultats, j'ai fait les antibiotiques de base sur les 3 souches donneuses de notre laboratoire, car j'avais rencontré des problèmes à insérer un plasmide de résistance au triméthoprime chez la souche SM-10. Ce que j'ai pu constater, c'est que notre souche d'*E. coli* SM-10 est totalement résistante au triméthoprime. Ce n'était pas le cas pour les souches χ 7213 et S-17. Même si ces deux souches sont moins efficaces pour la conjugaison, je n'avais pas le choix de les utiliser pour pouvoir insérer mon plasmide contenant la flippase qui permettait d'avoir une construction propre. Néanmoins, selon la littérature, la souche S-17 a été construite de sorte à être sensible à la kanamycine et résistante à triméthoprime alors que la souche SM-10 devrait être résistante à la kanamycine et sensible à la triméthoprime (Ferrières L. et al. 2010). Il faudrait répéter les résultats et investiguer d'avantage nos réserves d'*E. coli* et mes souches donneuses avant de pouvoir confirmer ces résultats de CMI puisqu'il y a probablement eu erreur de manipulation et inversion des souches.

En ce qui concerne les courbes de croissance, voire les figures 3.1 à 3.3, celles-ci ont été effectuées pour simplement savoir si des mutants du *quorum sensing* avaient des différences de croissance. Ce ne fut pas le cas, néanmoins l'absence de défauts ou d'avantages de croissance les rend intéressants pour étudier la production du biosurfactant inconnu. Néanmoins, j'ai décidé de ne pas intégrer ma construction Mini-CTX-*lux* chez ces mutants, car cela exigeait beaucoup de temps simplement pour obtenir mes deux premières constructions essentielles au projet (souche sauvage avec Mini-CTX-*lux* contenant, ou non, la région promotrice de *rhlABC*). De plus, il a été décidé de se concentrer sur la souche sauvage et l'obtention de conditions optimales de croissance le plus directement possible. Nous avons comme hypothèse qu'une fois que le biosurfactant sera purifié et identifié, il sera beaucoup plus optimal dans le temps de simplement faire des dosages en HPLC et spectromètre de masse pour étudier les mutants du *quorum sensing* et de nombreuses autres conditions.

4.2 Essais sur milieux sang et milieux *swarming*

Le tableau 3.3 présente les résultats d'un test d'hémolyse sur gélose pour voir si le biosurfactant inconnu de *B. cenocepacia* K56-2 était essentiel pour ce phénotype. *S. aureus* et *E. faecalis* ont servi de contrôle d'hémolyse et *P. aeruginosa* servait à la fois de contrôle et de comparatif puisqu'elle produit énormément de rhamnolipides. Cette expérience a été conçue en se basant sur le fait que le biosurfactant inconnu est probablement similaire à un rhamnolipide et que ce test fonctionne lorsque l'on compare un mutant *rhlA*- et une souche sauvage de *P. aeruginosa* (Johnson & Boese-Marrazzo, 1980, Jensen PO et al. 2007). De plus, un tel essai a déjà été conçu dans la littérature (Mulligan C et al. 1984), mais possède de nombreuses limites (Jain D et al.

1991). C'est pour cela que cet essai a été mis en place dans le cadre de ce projet en comparant les souches sauvages de *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* ainsi que leur mutant *rhIA*- pour qu'une différence de phénotype soit imputable qu'à la transcription de ce gène. En effet, ce ne sont pas tous les biosurfactants qui possèdent une activité hémolytique (Schulz et al. 1991), alors cette expérience était possible seulement parce que nous possédions un mutant *rhIA*- de notre souche d'intérêt. De plus il y avait des contrôles du phénotype d'hémolyse (*S. aureus*, *P. aeruginosa* possédant un double rôle dans cette expérience et *E. faecalis*) pour s'assurer de la qualité des géloses sang ainsi que des conditions d'incubation. Les souches sauvages ont tous eu le résultat attendu, soit une hémolyse partielle pour *B. cenocepacia* et *P. aeruginosa*, une hémolyse complète pour *S.aureus* et aucune hémolyse pour *E. faecalis* (Wanger, A. et al. 2017, Vasil M L et al. 1990). Le résultat intéressant se situe dans les mutants *rhIA*- (des mutants n'étant pas en mesure de produire leur biosurfactant). En effet, après 24 heures d'incubation, ces mutants ne sont pas en mesure de faire d'hémolyse, ce qui semble être cohérent puisque cette différence a déjà été notée dans la littérature chez *P. aeruginosa* (Johnson & Boese-Marrazzo, 1980, Jensen PO et al. 2007) où les rhamnolipides sont en mesure de faire de l'activité hémolytique β . Ce qui indique que le biosurfactant inconnu, tout comme les rhamnolipides, aurait probablement une activité hémolytique. Puisqu'ils agissent comme des savons, le fait qu'un biosurfactant soit hémolytique n'est pas surprenant, mais muter un seul gène pour perdre cette activité dans les 24 premières heures l'est. Même si notre biosurfactant inconnu n'est pas un rhamnolipide, cela pourrait indiquer qu'il s'agit tout de même d'un glycolipide puisque l'activité hémolytique est la même et qu'il est produit sur ce milieu vu la perte du phénotype d'hémolyse. Malheureusement, le test d'aérosolisation à l'huile n'est pas concluant sur ce milieu, ce qui semble indiquer que notre souche en produit peu ou que le biosurfactant soit peu soluble dans ce milieu comparativement aux rhamnolipides de *P. aeruginosa*. En effet, la solubilité en milieu hydrophile est un facteur important à garder en compte (Jain D et al. 1991) qui pourrait aussi être un facteur à considérer pour ce nouveau biosurfactant et les difficultés de détection rencontrées. Néanmoins, ce test a donné un nouveau phénotype indicateur de la production de notre biosurfactant, mais il n'est pas réaliste de faire des extractions et de la production à grande échelle à partir d'un milieu contenant du sang de mouton. Ce phénotype reste tout de même cohérent avec ce qui est attendu d'un glycolipide.

En ce qui concerne le phénotype *swarming*, malheureusement il n'y a eu aucun résultat concluant. Seul le milieu NB avec dextrose 0,5% présente un phénotype de *swarming* pour la souche sauvage qui se perd pour la souche *rhIA*-. Même si la perte de *swarming* suggère la présence et la production de ce biosurfactant, le milieu NB avec dextrose 0,5% n'est pas un milieu

optimal en liquide pour la production et l'extraction, et ce, même en milieu gélosé. Il n'y a donc pas de nouveautés de ce côté et il a fallu se tourner vers l'optimisation de la production en milieu liquide, d'où la nécessité de faire une construction Mini-CTX-*lux* avec la région promotrice de *rhlABC* en amont de l'opéron de la luciférase.

4.3 Clonage de la région promotrice de *rhlABC* de *B. cenocepacia* K56-2 et construction de la souche *B. cenocepacia* K56-2 ::CTX-*PrhIA-lux*

Initialement, l'amplification par PCR fut problématique. Tout comme le genre *Pseudomonas*, *Burkholderia* possède un génome riche en G-C, c'est-à-dire plus de 60%, (Labaer et al. 2004, Sawana et al. 2014) ce qui rend la création d'amorces et l'optimisation de la PCR plus difficile à cause des températures de dénaturation et la formation de structures secondaires sur l'ADN (Assal et Lin 2020, Borah 2011) ainsi que sur les amorces (Assal et Lin 2020, Borah 2011). Pour optimiser la PCR, il faut ajouter du DMSO et du MgSO₄ en plus des ingrédients usuels, et jouer avec la température d'hybridation des amorces (Assal et Lin 2020, Borah 2011). Avec ces deux petits changements dans la recette, les PCR de *B. cenocepacia* K56-2 se sont révélées être beaucoup plus simples à optimiser et effectuer. Ensuite, le clonage de la région promotrice de l'opéron *rhlABC* à l'intérieur du plasmide Mini-CTX-*lux* ne fonctionnait pas par ligation. Au début, nous avons cru que c'était un défaut de digestion, alors le produit PCR a été sous-cloné par TA *cloning* dans un autre plasmide, appelé pEasy (voir annexes pour la carte du plasmide). Ainsi, la digestion complète du fragment était plus facilement vérifiable par migration du gel d'agarose. Malgré cela, l'étape de ligation à partir de ce fragment n'a pas fonctionné et nous nous sommes tournées vers un protocole de type *seamless cloning* ce qui a permis d'obtenir les constructions voulues.

Ensuite, nous nous sommes tournés vers l'électroporation pour intégrer la construction Mini-CTX-*PrhIA-lux* chez *B. cenocepacia* K56-2, mais cela n'a pas fonctionné. En effet, l'électroporation s'est révélée être une méthode aucunement efficace pour la souche K56-2 avec les plasmides utilisés. Dans le cas du Mini-CTX-*lux*, la conjugaison a fonctionné du premier coup après optimisation des concentrations d'antibiotiques et du temps d'incubation.

Par la suite, je devais retirer la cassette de résistance à la tétracycline par flippase pour avoir une construction propre. La flippase est une enzyme qui reconnaît les régions FRT d'un plasmide afin d'exciser ce qui se trouve entre les deux séquences (Ishikawa et Hori 2013), dans ce cas-ci ceux entourant la résistance à la tétracycline du plasmide Mini-CTX-*lux* (voir annexes pour la carte du plasmide). Cette enzyme est produite via un gène situé sur un plasmide. Les plasmides disponibles au laboratoire n'ont pas fonctionné chez notre souche. Le laboratoire de Léo Eberl

avait publié les plasmides pBBR5 :: FLP Gen^R et pBBR5 :: FLP Gen^R/Tc^R. Ces plasmides contenant la flippase sont fonctionnels chez la souche K56-2. Nous ne pouvions enlever la résistance présente à la tétracycline avec les plasmides pBBR5 reçus puisque *B. cenocepacia* K56-2 résiste à la gentamicine et possédait déjà une résistance à la tétracycline via l'intégration du Mini-CTX-*lux*. Il a alors été nécessaire de retirer la cassette de résistance à la tétracycline pour y ajouter une cassette de résistance à la triméthopime.

4.4 Cinétique de luminescence et sélection d'un milieu de culture optimisé

4.4.1 Sélection à partir d'une base M9

Dans les figures 3.4 et 3.5, il est possible de voir l'effet de différents milieux sur la cinétique de transcription du promoteur de *rhlABC*. Encore une fois, il est important de rappeler que la production de luciférase n'est pas égale à la production du biosurfactant. Cela veut simplement dire que l'opéron qui permet sa production est transcrit chez *B. cenocepacia* K56-2. Nous posons tout de même l'hypothèse qu'en optimisant le milieu, on devrait augmenter suffisamment la production pour permettre sa détection et purification. Dans cette première série d'expériences, l'objectif était tout simplement de tester des milieux de culture déjà utilisés à notre laboratoire pour avoir un point de départ. Un milieu défini est beaucoup plus facile à travailler et à extraire, car on sait exactement ce qu'il contient. J'ai alors choisi la base minérale M9 pour optimiser la source de carbone et d'azote pour la production du biosurfactant. Comme on peut le constater, le milieu M9 acides casamino (CAA) et dextrose (Figure 3.4 et 3.5), offre une meilleure expression du rapporteur que des milieux complexes (NB, LB et TSB). Alors, il a été convenu de commencer avec une base minérale pour avoir un meilleur contrôle sur son contenu et son optimisation. À partir de cette base minérale M9, l'objectif était de trouver une meilleure source de carbones et d'azotes pour notre souche pour augmenter la quantité de biosurfactant produit. Les tableaux 2.1 et 2.2 représentent les différentes sources de carbones et d'azotes qui ont été testées pour des tests de croissance et, par la suite, des combinaisons ont été effectuées à partir de ceux qui présentaient de la croissance. Le graphique 3.6 représente un exemple de résultats obtenus à partir desquels des décisions ont été prises. Finalement, seuls les milieux du graphique 3.7 ont été sélectionnés après des tests en plaque de 96 puits et des tests en tube de 5 mL. En effet, les phénotypes observés en plaque de 96 puits n'étaient pas nécessairement tous répétables en tubes de 5 mL. Les plaques à 96 puits permettent de faire un criblage à grande échelle de conditions de croissance, mais peuvent contenir plusieurs biais dans les résultats dont l'évaporation, l'agitation, la température, l'étanchéité de la plaque 96 puits et des biais spécifiques à chaque machine (Kurokawa et Ying 2017) qui font que le transfert des conditions en tubes de

5 mL ne sont pas nécessairement répétables ou idéales pour les bactéries. Cette méthode de criblage avec le rapporteur aura tout même permis de tester rapidement presque une centaine de milieux de culture pour finalement choisir le milieu M9-Proline-Leucine qui était le meilleur milieu possible en base minérale M9. Néanmoins, ce milieu était loin d'être optimal. Peu importe les conditions de croissance, que ce soit la température, l'agitation ou le temps d'incubation, il était impossible d'avoir une transcription du rapporteur *PrhIA-lux* en dehors de la phase exponentielle et d'avoir la détection d'une différence entre la souche sauvage de *B. cenocepacia* et son mutant *rhlA-*.

4.4.2 Sélection de la base BSM et choix final des conditions de production

Finalement, en regardant les résultats supplémentaires d'un article d'Eshwar Mahenthiralingam (2013), nous avons découvert qu'ils étaient en mesure de transcrire les gènes de notre biosurfactant en phase stationnaire de croissance en étudiant un autre phénotype. Puisque l'hypothèse principale est que les conditions utilisées jusqu'à présent ne permettent pas une assez grande production du biosurfactant et que les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que les conditions utilisées permettent qu'une transcription en phase exponentielle de croissance (figure 3.4, 3.5 et 3.8), une autre hypothèse est alors devenue plausible : une production en phase stationnaire de croissance permettrait d'augmenter la concentration du biosurfactant et donc la quantité extraite pour permettre son identification. Nous avons alors décidé de tester la base minérale BSM tout en gardant la même source de carbone et d'azote choisies pour donner suite aux essais avec la base M9, soient la proline et la leucine. On a comparé le milieu BSM-Proline-Leucine, TSB (milieu riche glucosé, non défini) et M9-Proline-Leucine et ces résultats sont présents dans la figure 3.8. Comme on peut le constater, il n'y a que très peu de transcription du biosurfactant en milieu TSB. Ce milieu n'est pas présent sur le graphique, mais le milieu NB glucose 0,5% est quasi-identique par rapport à la base M9 et BSM en termes de transcription des gènes codant pour les enzymes probablement impliquées dans la biosynthèse du biosurfactant inconnu biosurfactant. Ce que l'on peut constater c'est qu'effectivement, le milieu M9 permet une activité du rapporteur seulement en phase exponentielle de croissance et que la densité optique est loin d'atteindre celle vue dans le milieu TSB et BSM. Quant au milieu BSM, il y a autant de croissance que le milieu TSB malgré le fait que ce soit un milieu défini minéral ce qui est très bon signe puisque nous connaissons la composition exacte du milieu, au contraire du TSB, alors il est possible de jouer sur les composantes pour optimiser la luminescence du rapporteur. En plus d'avoir une aussi bonne croissance que le milieu TSB, le milieu BSM-Proline-Leucine présente une transcription tout au long de la croissance, même en phase stationnaire, ce qui n'était pas le

cas du milieu M9. Évidemment, il fallait optimiser la quantité de milieux à extraire d'un coup et l'agitation. Les explications seront détaillées dans les sections 4.5 et 4.6, mais la meilleure condition qu'il a été possible d'attendre au cours de cette maîtrise est 750 mL de milieu BSM-Proline-Leucine dans un Erlenmeyer de 2L à 37°C en culture stationnaire (sans agitation). Une optimisation du pH, de la température, de l'aération et etc. sera éventuellement à faire lorsque la structure du biosurfactant sera résolue car cela nous permettrait de le quantifier directement par HPLC sans extractions chimiques.

4.5 Extraction chimique du biosurfactant et optimisation de la méthode

Plusieurs méthodes d'extraction ont été tentées, mais au bout du compte j'ai dû venir à l'évidence que la méthode d'extraction la plus simple est bien souvent la meilleure. Plusieurs méthodes étaient essayées et seulement une extraction avec un mélange eau/méthanol/chloroforme a montré des résultats présentant une différence entre la souche sauvage et son mutant *rhIA*- comme montré par la figure 3.10. En effet, on peut voir la présence d'une tache avec l'extraction au chloroforme qui n'est pas présente pour le mutant *rhIA*-. Quant à l'extraction avec l'acétate d'éthyle, on ne remarque pas l'absence d'une tache. De plus, le méthanol provoque beaucoup d'émulsion. Rappelons que l'orcinoïl est un révélateur des glycolipides qui ont migré sur plaque de silice (CCM, ou chromatographie sur couche mince). Le mélange eau/méthanol/acétate d'éthyle, quant à lui, émulsionne beaucoup trop et c'est probablement ce qui a empêché de faire une extraction adéquate. Le protocole est vraiment important à suivre à la lettre pour éviter le plus possible une émulsion trop importante ou la présence de culot bactérien pouvant fausser les résultats puisque notre surfactant est présent dans le surnageant et le solvant d'extraction. De plus, le culot bactérien est difficile à éliminer et l'extraction fonctionne quand les bactéries sont en contact avec le solvant, alors on ne peut pas retirer ces étapes de filtration et de centrifugation. Plusieurs solvants d'extraction sont toujours à essayer et pourrait s'avérer plus concluant que le mélange trouvé ici. En effet les solvants suivants ont déjà montré leur efficacité quant à l'extraction des biosurfactants : chloroforme, méthanol butanol, acétate d'éthyle, hexane avec divers ratios de solvants tel que par exemple chloroforme et méthanol en ratio 2:1. (Demling P et al. 2020, Invally K et al. 2019, Çakmak H et al. 2017). D'ailleurs, d'autres paramètres, tel que le pH (Hippolyte MT et al. 2018) pourraient être pris en compte pour améliorer l'extraction. De plus, une étude récente a montré que plusieurs paramètres peuvent être optimisés et que même certaines étapes (précipitation à l'acide dans le cas présent) peuvent être éliminées pour faciliter les extractions (Goyal et Singh 2022). Même si cet article a travaillé avec une glycoprotéine et non un glycolipide (Goyal et Singh 2022), il démontre tout de même la nécessité de prendre en

compte les 7 paramètres suivants pour les futures extractions : la précipitation à l'acide, le solvant utilisé, le ratio de solvants, la quantité de culture par rapport au solvant, la température d'extraction, le pH et le temps d'extraction. De plus, la méthode utilisée pour extraire un nouveau rhamnolipide, tel que celui vu dans *Achromobacter* spp. (Saurav et Tapas 2019) pourrait servir avec prudence car la nature du glycolipide de *B. cenocepacia* reste inconnu même si on s'attend à une similitude avec les rhamnolipides.

4.6 Essais de biofilms et observation du phénotype pellicule

Tout d'abord, parlons du phénotype pellicule obtenu dans les figures 3.11 et 3.12. Ce phénotype a été découvert par hasard en observant mes plaques à 96 puits lors des expériences de luminescence. J'ai remarqué la présence et l'absence de pellicules dans certains puits après 72 heures et je me suis demandé si ce phénotype était reproductible dans d'autres conditions. Comme on peut le voir dans les figures 3.11 et 3.12, *B. cenocepacia* K56-2 *rhIA*- n'est pas en mesure de faire une pellicule en surface, dans les milieux TSB et BSM-Proline-Leucine. Le milieu TSB n'est pas un milieu qui permet la transcription du rapporteur (Figure 3.8) tandis que le milieu BSM-Proline-Leucine le permet sur toutes les phases de croissance. Il est important de rappeler qu'une pellicule de surface n'est pas un biofilm à proprement dit puisque l'attachement est irréversible et ne devrait pas être en mesure d'être éliminé par l'équivalent d'un rinçage doux (Donlan 2002).

Il était alors important d'observer si le phénotype de biofilm était cohérent avec celui de la formation d'une pellicule, puisque les cultures stationnaires sont aussi propices à sa formation (Donlan 2002) et pourrait aider à mieux comprendre l'effet du biosurfactant ou même confirmer sa production. Selon la littérature, une faible concentration de biosurfactant permet l'adhésion des biofilms et une forte concentration permet sa dispersion (Nickzad et al. 2013). Selon la figure 3.9, on semble avoir le résultat inverse de ce qui est attendu par la précédente affirmation. En effet, en milieu TSB, où la transcription du rapporteur *PrhIA-lux* est faible, il y a meilleur adhésion en absence de biosurfactant. Alors qu'en milieu BSM Pro-Leu, où la transcription du rapporteur *PrhIA-lux* plus élevée, il y a meilleure dispersion du biofilm. Notre biosurfactant serait potentiellement une exception à la règle en ce qui concerne la formation des biofilms si on suit l'hypothèse que la transcription est proportionnelle à la concentration du biosurfactant. Malgré tout, le phénotype de pellicule semble totalement dépendant de la simple présence du surfactant peu importe sa concentration. Il n'y aurait donc potentiellement pas de liens entre la formation d'une pellicule et la formation de biofilms chez *B. cenocepacia* K56-2. L'ensemble de ces phénotypes rend ce biosurfactant particulièrement important à purifier, synthétiser, isoler et

caractériser puisque l'on pourrait mieux comprendre le rôle de certains biosurfactants atypiques comme facteur de virulence ou tout simplement découvrir une nouvelle structure qui permettrait toutes sortes d'applications au niveau des biotechnologies.

4.7 Les travaux sur *Burkholderia lata* et comparaisons de son opéron *rhlABC*

Très récemment, l'équipe du Prof. Karl-Erich Jaeger (Université Heinrich Heine de Düsseldorf, Allemagne) nous a contacté à propos d'un biosurfactant qu'ils étaient en train de purifier, mais qu'ils n'étaient pas en mesure d'identifier. Nous avons appris qu'ils travaillaient sur *Burkholderia lata*, un autre membre du BCC qui contient un opéron *rhlABC* avec une méthyltransférase probable. Cet opéron est très bien conservé au sein des BCC. Veuillez-vous référer à la section 1.2.4 de l'introduction pour un rappel sur les généralités de l'opéron *rhlABC*. Lorsque l'on fait des comparaisons de l'opéron *rhlABC*, on découvre que la portion ne contenant pas la méthyltransférase est plus de 99 % identique entre *B. lata* et *B. cenocepacia* K56-2. Quand on compare le gène de la méthyltransférase, on découvre qu'il est 100% identique entre les deux souches ! (Vérification faite à partir du site burkholderia.com, qui utilise le logiciel BLAST, mais dédié aux *Burkholderia* spp.). Nos analyses préliminaires sur leurs extraits ne nous permettent pas d'avoir une structure 100% résolue, mais nous permettent de confirmer que *Burkholderia lata* produit un rhamnolipide méthylé au niveau de son ou ses rhamnoses (selon que ce soit un mono ou di-rhamnolipide). Le gène prédit comme étant une méthyltransférase serait donc bel et bien responsable d'une étape de méthylation de rhamnolipides. Le plus étonnant c'est que lorsque l'on compare un extrait de *B. cenocepacia* avec *B. lata*, les résultats semblent indiquer que *B. cenocepacia* ne produit pas le même biosurfactant que *B. lata*. Mon hypothèse est la suivante : la méthyltransférase, étant 100% identique entre les deux souches, a probablement la même fonction que celle de *B. lata*, soit de méthyler le sucre du biosurfactant. Néanmoins, le biosurfactant majoritaire de *B. cenocepacia* ne possède pas un rhamnose comme sucre ou à une structure plus particulière (comme *Pantoea ananatis* avec son ananatoside A et B) et la méthylation du biosurfactant se ferait autrement à cause de cela. Comme le gène de la méthyltransférase est conservé et identique à 100% avec *B. lata*, il y a forcément une méthylation sur le biosurfactant inconnu sinon, en ce qui concerne l'évolution, notre souche n'aurait aucune pression pour conserver cette enzyme et l'aurait perdu relativement rapidement. Métaboliquement, cette méthylation ou la présence d'un autre sucre que le rhamnose pourrait changer la spécificité d'autres enzymes qui sont en dehors de l'opéron, ce qui pourrait permettre la formation de structures complexes et plus particulières (comme encore une fois l'ananatoside A et B de *P. ananatis*). Il est probable que le biosurfactant ressemble à un rhamnolipide, car après

tout, cela reste un opéron *rhlABC*. La structure de l'ananatoside B n'est qu'un rhamnolipide pour lequel le rhamnose a été interchangé par un glucose, mais les voies métaboliques de la bactérie permettent aussi la cyclisation de ce glucolipide pour former l'ananatoside A. Comme *B. cenocepacia* est très peu étudiée en dehors de son *quorum sensing* et de sa pathogénicité, qui sait ce que ses voies métaboliques seraient en mesure de faire si elle produit bel et bien un biosurfactant similaire à un rhamnolipide (possédant un sucre autre que le rhamnose et une méthylation sur ce même sucre). On pourrait découvrir en plus du biosurfactant principal, une molécule qui n'est pas un biosurfactant. Malheureusement, vu la contrainte de temps reliée à cette maîtrise, nous n'avons pas été en mesure de purifier et d'élucider la structure du biosurfactant. Cela nous laisse sur beaucoup de questions et d'hypothèses sur la structure, les propriétés et les sous-produits du biosurfactant provenant de l'opéron *rhlABC* de *B. cenocepacia* K56-2. Néanmoins, les nouvelles données obtenues sur la méthyltransférase de *B. lata* et les ananatosides de *P. ananatis* nous permettent d'aiguiller nos recherches et d'avoir des attentes et hypothèses beaucoup plus réalistes sur la structure de ce nouveau biosurfactant.

4.8 Perspectives du projet

Tout d'abord, les méthodes de biologie moléculaire pour faire des clonages, mutations, délétions et autres auront été mises à jour et adaptées à la souche K56-2. Le laboratoire pourra désormais travailler sur *B.cenocepacia* K56-2 beaucoup plus facilement et développer une expertise sur cette souche. Quoique déjà en cours chez nos collègues de l'équipe de l'Université Heinrich Heine de Düsseldorf, en Allemagne, il faudrait étudier l'effet de la méthyltransférase et de son enzyme sur les rhamnolipides de *P.aeruginosa* et les ananatosides de *P.ananatis* pour développer de nouveaux surfactants et confirmer l'effet de l'enzyme chez une autre espèce via un clonage. Il faut aussi évidemment isoler, purifier et résoudre la structure du biosurfactant. Pour son isolation, une simple extraction eau/chloroforme serait à essayer pour voir si le résultat se répète après une révélation à l'orcinol. Une fois purifié, et la méthode d'extraction simplifiée, cela permettrait de le caractériser physico-chimiquement et découvrir de potentiels congénères. Il sera alors aussi possible de le synthétiser pour en avoir en plus grande quantité. De plus, une fois identifié, on pourra étudier divers mutants, tels que ceux du *quorum sensing* pour étudier l'effet du *quorum sensing* sur la production du biosurfactant sans passer par le rapporteur Mini-CTX-*lux*, mais plutôt directement par nos appareils de HPLC-MS. De plus, ce projet aura permis d'optimiser une méthode de transformation et de clonage spécifique et efficace, de rendre cette construction propre via une flippase, en plus d'optimiser au mieux possible la production ainsi que l'extraction du biosurfactant inconnu de *B. cenocepacia* K56-2. Pour compléter le projet, il restera à identifier le surfactant à partir d'une molécule pure obtenue par HPLC ou autre. Cela

nous permettra de faire de meilleures optimisations puisque nous serons en mesure de quantifier directement notre surfactant sans passer par un rapporteur transcriptionnel ou des extractions. Il sera aussi possible d'identifier des gènes d'intérêts pouvant augmenter ou baisser la production par des évolutions dirigées. Finalement, avec une identification de la structure chimique du surfactant, on pourra envisager de la synthétiser chimiquement et faire des études physicochimiques pour savoir si la structure apporte de nouvelles propriétés pour des applications spécifiques.

Chapitre 5: Conclusion

Pour conclure ce mémoire, je crois qu'il est important de se rappeler que tout ce que nous savions au début de ce projet, c'est que *B. cenocepacia* K56-2 produit très probablement un nouveau biosurfactant (grâce aux travaux de plusieurs personnes dans notre laboratoire). Néanmoins, nous n'avons pas réussi à l'extraire et l'identifier. Dans le cadre de ce projet, j'aurai réussi à optimiser une méthode de clonage pour transférer un gène ou une région promotrice de *B. cenocepacia* K56-2. Cette construction aura permis de remplacer la méthode de détection usuelle d'un biosurfactant (Drop collapse, extraction, aérosolisation, swarming) par une méthode plus quantitative et indirecte pour les cas où le biosurfactant est difficile à détecter : un rapporteur transcriptionnel couplé à la luminescence. J'ai alors optimisé le milieu de culture à l'aide de la construction en trouvant la base minérale, la source de carbone et la source d'azote optimale qui donnaient, une fois combinée, nous permettait d'isoler une molécule par extraction qui serait potentiellement notre biosurfactant. On aura tout d'abord commencé par une base minérale M9-Proline-Leucine, un milieu minimal défini pour ensuite changer la base minérale M9 pour une base minérale BSM. Ce changement aura permis l'expression de la luminescence non pas juste en phase exponentielle comme avec une base M9, mais aussi en phase stationnaire. J'aurai tenté d'optimiser l'extraction pour finalement réaliser que la méthode la plus simple d'extraction est parfois encore la meilleure. Finalement, nous avons des indices via un projet parallèle d'identification du biosurfactant de *B. lata* que le biosurfactant que l'on recherche est méthylé et que la méthyltransférase putative en est bien une. Néanmoins, le biosurfactant de *B. lata* n'est pas celui que nous recherchons puisque nous ne détectons pas ce surfactant chez notre souche. Nous avons plusieurs indices de la production du surfactant dans notre nouveau milieu optimal (biofilm, pellicule, tâche sur TLC et disque de diffusion). Il faut maintenant en produire assez d'extrait pour pouvoir passer en purification sur nos instruments qui permettront la résolution finale de la structure.

Bibliographie

- Abdel-Mawgoud A, Hausmann R, Lépine F, Müller M, Déziel E (2010) Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. *Biosurfactants: From Genes to Applications* Vol 20. p 13-55.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(5):1323-1336.
- Adamczak M, Bednarski W (2000) Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters* 22:313-316.
- Adetunji AI (2017) *Treatment of lipid-rich wastewater using free and immobilized bioemulsifier and hydrolytic enzymes from indigenous bacterial isolates*. Ph.D thesis (University of KwaZulu-Natal, Durban South Africa).
- Adetunji AI, Olaniran AO (2021) Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(1):669-679.
- Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen P, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, Christensen LD, van Gennip M, Parsek M, Høiby N, Rasmussen TB, Givskov M (2009) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 11):3500-3508.
- 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.
- Anderson G.G. OTGA (2008) Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. *Bacterial Biofilms.*, T. R (Édit.) Springer, Berlin, Heidelberg, Current Topics in Microbiology and Immunology Vol 322.
- Assal N, Lin M. PCR procedures to amplify GC-rich DNA sequences of *Mycobacterium bovis*. *J Microbiol Methods*. 2021 Feb;181:106121.
- 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*. *Sci Rep* 8(1):2905.
- Banat IM (1995) Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* 51(1):1-12.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):427-444.

- Batista SB, Mouteer AH, Amorim FR, Tótola MR (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol* 97(6):868-875.
- Becher A, Schweizer HP (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *Biotechniques* 29(5):948-950, 952.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A (2004) Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85(1):1-8.
- Bernier S, Nguyen D, Sokol P (2008) A LysR-Type Transcriptional Regulator in *Burkholderia cenocepacia* Influences Colony Morphology and Virulence. *Infection and immunity* 76:38-47.
- Bernier SP, Sokol PA (2005) Use of suppression-subtractive hybridization to identify genes in the *Burkholderia cepacia* complex that are unique to *Burkholderia cenocepacia*. *J Bacteriol* 187(15):5278-5291.
- Bodour AA, Miller-Maier RM (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 32(3):273-280.
- Borah P. Primer designing for PCR. *Sci Vis.* 2011;11(3):134–6
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13(1):20-26.
- 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.
- Çakmak H, Güngörmedi G, Dikmen G, Çelik PA, Çabuk A (2017) The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affect rhamnolipid characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119(10):1700002.
- Cameotra SS, Makkar RS (2004) Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol* 7(3):262-266.
- Carmody LA, Zhao J, Kalikin LM, LeBar W, Simon RH, Venkataraman A, Schmidt TM, Abdo Z, Schloss PD, LiPuma JJ (2015) The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. *Microbiome* 3:12.
- Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* 2(6):443-448.
- Chong H, Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact* 16(1):137.

- Chrzanowski Ł, Ławniczak Ł, Czaczyk K (2012) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World journal of microbiology & biotechnology* 28(2):401-419.
- Cloutier M, Prévost M-J, Lavoie S, Feroldi T, Piochon M, Groleau M-C, Legault J, Villaume S, Crouzet J, Dorey S, Diaz De Rienzo MA, Déziel E, Gauthier C (2021) Total synthesis, isolation, surfactant properties, and biological evaluation of ananatosides and related macrodilactone-containing rhamnolipids. *Chemical science* 12(21):7533-7546.
- Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 39(10):3427-3436.
- Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJ, Kosaric N (1981) Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Applied and environmental microbiology* 42(3):408-412.
- Cormier MJ, Hori K, Karkhanis YD, Anderson JM, Wampler JE, Morin JG, Hastings JW (1973) Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates. *Journal of Cellular Physiology* 81(2):291-297.
- Coutinho TA, Venter SN (2009) *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular plant pathology* 10(3):325-335.
- Dalmastri C, Fiore A, Alisi C, Bevivino A, Tabacchioni S, Giuliano G, Sprocati AR, Segre L, Mahenthiralingam E, Chiarini L, Vandamme P (2003) A rhizospheric *Burkholderia cepacia* complex population: genotypic and phenotypic diversity of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. *FEMS Microbiology Ecology* 46(2):179-187.
- 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 Cássia F S Silva R, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2014) Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences* 15(7):12523-12542.
- Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 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. *Biochim Biophys Acta* 1440(2-3):244-252.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R (2003) rhIA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology (Reading)* 149(Pt 8):2005-2013.

- Diaz De Rienzo MA, Stevenson PS, Marchant R, Banat IM (2016) Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(13):5773-5779.
- 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.
- Duthie ES, Lorenz LL. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol.* 1952 Feb;6(1-2):95-107.
- Ferrières, Lionel & Hémerly, Gaëlle & Nham, Toan & Guérout, Anne-Marie & Mazel, Didier & Beloin, Christophe & Ghigo, Jean-Marc. (2010). Silent Mischief: Bacteriophage Mu Insertions Contaminate Products of Escherichia coli Random Mutagenesis Performed Using Suicidal Transposon Delivery Plasmids Mobilized by Broad-Host-Range RP4 Conjugative Machinery. *Journal of bacteriology.* 192. 6418-27. 10.1128/JB.00621-10.
- Fracchia L, Cavallo M, Martinotti M, Banat I (2012) Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications Present Status and Future Potentials. *Biomedical Science and Engineering Technology* 10.5772/23821.
- Fuqua C, Greenberg EP (1998) Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* 1(2):183-189.
- Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):685-695.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176(2):269-275.
- Gauthier C, Lavoie S, Piochon M, Martinez S, Milot S, Déziel E (2019) Structural determination of ananatoside A: An unprecedented 15-membered macrodilactone-containing glycolipid from *Pantoea ananatis*. *Carbohydr Res* 471:13-18.
- Germer A, Tiso T, Müller C, Behrens B, Vosse C, Scholz K, Froning M, Hayen H, Blank LM (2020) Exploiting the Natural Diversity of RhIA Acyltransferases for the Synthesis of the Rhamnolipid Precursor 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 86(6).
- Gudiña EJ, Pereira JFB, Costa R, Evtuguin DV, Coutinho JAP, Teixeira JA, Rodrigues LR (2015) Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial Cell Factories* 14(1):14.
- Goyal, S., and Singh, J. (2022). Biphasic liquid-liquid extraction of biosurfactant from *Lactobacillus delbrueckii*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 65, 2022210325
- Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, 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.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11(7):1034-1043.

- Haloi, S.; Medhi, T. Optimization and characterization of a glycolipid produced by *Achromobacter* sp. to use in petroleum industries. *J. Basic Microbiol.* **2019**, 59, 238–248.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4):557-580.
- Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading)* 153(Pt 4):917-923.
- Horowitz S, Gilbert JN, Griffin WM (1990) Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology* 6(4):243-248.
- Hippolyte MT, Augustin M, Hervé TM, Robert N, Devappa S. Application of response surface methodology to improve the production of antimicrobial biosurfactants by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* N2 using sugar cane molasses as substrate. *Biores Bioprocess.* 2018;5:1-6.
- Ibacache-Quiroga C, Ojeda J, Espinoza-Vergara G, Olivero P, Cuellar M, Dinamarca MA (2013) The hydrocarbon-degrading marine bacterium *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1 produces a biosurfactant that interferes with quorum sensing of fish pathogens by signal hijacking. *Microb Biotechnol* 6(4):394-405.
- Ishikawa M, Hori K. A new simple method for introducing an unmarked mutation into a large gene of non-competent Gram-negative bacteria by FLP/FRT recombination. *BMC Microbiol.* 2013 Apr 17;13:86.
- Jain D, Collins-Thompson DL, Lee H, Trevors JT (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13(4):271-279.
- Jarvis FG, Johnson MJ (1949) A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society* 71(12):4124-4126.
- Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2007;153:1329–38.(Wanger et al., 2017)
- Johnson MK, Boese-Marrazzo D. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1980 Sep;29(3):1028-33.
- Kang Y, Son MS, Hoang TT (2007) One step engineering of T7-expression strains for protein production: increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein expression and purification* 55(2):325-333.
- Karant NGK, Deo PG, Veenanadig NK (1999) Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science* 77(1):116-126.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8(9):634-644.

- Kirchner S, Fothergill JL, Wright EA, James CE, Mowat E, Winstanley C (2012) Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/3857(64):e3857-e3857.
- Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère JC (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182(21):5990-5996.
- Kownatzki R, Tümmler B, Döring G (1987) Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1(8540):1026-1027.
- Kurokawa M, Ying BW. Precise, High-throughput Analysis of Bacterial Growth. *J Vis Exp.* 2017 Sep 19;(127):56197.
- Labaer J, Qiu Q, Anumanthan A, Mar W, Zuo D, Murthy T V, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. *Genome Res.* 2004;14(10B):2190–200
- Lewis K (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 70(2):267-274.
- Lipuma JJ (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23(2):299-323.
- Mah TF, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1):34-39.
- Mahenthiralingam E, Coenye T, Chung Jacqueline W, Speert David P, Govan John RW, Taylor P, Vandamme P (2000) Diagnostically and Experimentally Useful Panel of Strains from the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 38(2):910-913.
- Majerczyk CD, Brittnacher MJ, Jacobs MA, Armour CD, Radey MC, Bunt R, Hayden HS, Bydalek R, Greenberg EP (2014) Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *Journal of Bacteriology* 196(22):3862-3871.
- Mao X, Jiang R, Xiao W, Yu J (2015) Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *J Hazard Mater* 285:419-435.
- Marchant R, Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 30(11):558-565.
- Martinez S, Humery A, Groleau M-C, Déziel E (2020) Quorum Sensing Controls Both Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoate Production in *Burkholderia thailandensis* Through ScmR Regulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:1033-1033.
- Matz C, Kjelleberg S (2005) Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 13(7):302-307.

- McClure CD, Schiller NL (1996) Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Curr Microbiol* 33(2):109-117.
- Mulligan C, Cooper DG, Neufeld RJ (1984) Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology* 62:311-314.
- Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* 112(1):73-79.
- Nickzad, A, and E Déziel. "The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control?." *Letters in applied microbiology* vol. 58,5 (2014): 447-53.
- Nickzad A (2012) *La régulation et l'optimisation de la production des rhamnolipides chez Burkholderia glumae*. Thèse Ph.D (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- 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).
- Noordman WH, Janssen DB (2002) Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 68(9):4502-4508.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176(7):2044-2054.
- Ochsner UA, Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6424-6428.
- Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189(6):2531-2539.
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260(5111):1127-1130.
- Preethy C, Das N (2010) Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2.
- Que Y-A, Hazan R, Strobel B, Maura D, He J, Kesarwani M, Panopoulos P, Tsurumi A, Giddey M, Wilhelmy J, Mindrinos MN, Rahme LG (2013) A quorum sensing small volatile molecule promotes antibiotic tolerance in bacteria. *PLoS one* 8(12):e80140-e80140.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 1995 Jun 30;268(5219):1899-902. doi: 10.1126/science.7604262. PMID: 7604262.

- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90.
- Roy A (2017) A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications* 8.
- Sass AM, Schmerk C, Agnoli K, Norville PJ, Eberl L, Valvano MA, Mahenthiralingam E (2013) The unexpected discovery of a novel low-oxygen-activated locus for the anoxic persistence of *Burkholderia cenocepacia*. *Isme j* 7(8):1568-1581.
- Satpute S, Bhawsar B, Dhakephalkar P, Chopade PB (2008) Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences* 37:243-250.
- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front Genet*. 2014 Dec 19;5:429.
- Schulz D, Passeri A, Schmidt M. et al. *Marine biosurfactants*. 1. Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. *Z Naturforsch (C)*. 1991;46(3-4):197–203.
- Schwab U, Abdullah LH, Perlmutter OS, Albert D, Davis CW, Arnold RR, Yankaskas JR, Gilligan P, Neubauer H, Randell SH, Boucher RC (2014) Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. *Infect Immun* 82(11):4729-4745.
- Sha R, Jiang L, Meng Q, Zhang G, Song Z (2012) Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *J Basic Microbiol* 52(4):458-466.
- Sha R, Meng Q (2016) Antifungal activity of rhamnolipids against dimorphic fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology* 62.
- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* 334(6058):986-990.
- Siegmund I, Wagner F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques* 5(4):265-268.
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1(9):784-791.
- 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*. *mSphere* 1(1).
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(6):718-725.

- Stanley NR, Lazazzera BA (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 52(4):917-924.
- Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G, Eberl L (2013) Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence* 4(5):400-409.
- Tedesco P, Maida I, Palma Esposito F, Tortorella E, Subko K, Ezeofor CC, Zhang Y, Tabudravu J, Jaspars M, Fani R, de Pascale D (2016) Antimicrobial Activity of Monoramnholipids Produced by Bacterial Strains Isolated from the Ross Sea (Antarctica). *Mar Drugs* 14(5).
- 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.
- Tremblay, Yannick & Hathroubi, Skander & Jacques, Mario. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78.
- Uzoigwe C, Burgess JG, Ennis CJ, Rahman PKSM (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology* 6(245).
- Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PØ, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T, Pier GB, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117(7):537-546.
- Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthalingam E, LiPuma JJ, Govan JR (2003) *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol* 154(2):91-96.
- Vasil M L, Krieg D P, Kuhns J S, Ogle J W, Shortbridge V D, Ostroff R M, Vasil A I. Molecular analysis of hemolytic and phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*. *Infect Immun*. 1990;58:4020–4029.
- Victor IU, 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* 103(16):6505-6517.
- Vijayakuma S, Varatharajan S (2015) Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology* 10:181-192.
- Volkering F, Breure AM, Rulkens WH (1997) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8(6):401-417.
- Walter V, Sylatk C, Hausmann R (2010) Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv Exp Med Biol* 672:1-13.

- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Chapter 6 - Overview of Bacteria. In A. Wanger, V. Chavez, R. S. P. Huang, A. Wahed, J. K. Actor, & A. Dasgupta (Eds.), *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology* (pp. 75-117). Elsevier.
- Wang S, Payne G, Bentley W (2018) Repurposing *E. coli* by Engineering Quorum Sensing and Redox Genetic Circuits. 10.5772/intechopen.81245.
- Wang W, Cai B, Shao Z (2014) Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. *Frontiers in Microbiology* 5(711).
- Weuster-Botz D (2000) Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(5):473-483.
- Yan X, Sims J, Wang B, Hamann MT (2014) Marine actinomycete *Streptomyces* sp. ISP2-49E, a new source of Rhamnolipid. *Biochemical systematics and ecology* 55:292-295.
- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* 56(3):339-347.
- Zhang Y, Miller RM (1995) Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6):2247-2251.

Annexes

Annexe 1 : Informations importantes pour la reprise du projet

La majorité des informations peuvent être déduites en lisant mon cahier de laboratoire en ligne (Lab Guru) ainsi que ce mémoire, mais je vais résumer au mieux dans cette section pour les prochaines personnes qui essayeront de faire du clonage sur *B. cenocepacia* K56-2 ou de travailler sur son surfactant en général. Pour le clonage, il ne faut pas passer par les méthodes classiques (Digestion, ligase, etc.) ou les méthodes connues pour fonctionner chez des bactéries telles que *Burkholderia thailandensis* ou même *Burkholderia ambifaria* (qui est une BCC et près de 99% identique). Il faut utiliser directement le kit *Seamless cloning* avec ma méthode de PCR qui inclut du DMSO et du MgSO₄. Il ne faut pas trop se battre non plus avec l'électroporation, c'est à essayer une fois pas plus ! Par défaut, je passerais par la conjugaison. Pour la conjugaison, je conseille aussi d'essayer les trois souches de *E. coli* conjugantes du laboratoire en parallèle (S-17, SM-10 et χ 7213), car les plasmides spécifiques à *B. cenocepacia* ne fonctionnent pas nécessairement chez toutes les souches d'*E. coli* (rappel que les plasmides pBBR5 ne fonctionnent pas chez SM-10). Il faut aussi ne pas être surpris si un plasmide que l'on pense être à spectre large pour les bactéries à Gram négatif ou fonctionnel chez *B. ambifaria* ne fonctionne pas chez K56-2 (la flippase classique qui fonctionne chez *B. ambifaria* et qui ne fonctionnait pas chez *B. cenocepacia* a provoqué la partie du projet sur le plasmide pBBR5 et sa modification). Le milieu optimal pour la production en ce moment est le milieu BSM avec Proline et Leucine en phase stationnaire pendant 96 heures dans la chambre à 37°C. Je faisais 750 mL de culture dans des erlenmeyer de 2 L. Ensuite, il suffit de suivre le protocole optimisé d'extraction du mémoire ou de mon cahier de labo en ligne (c'est la prochaine étape, car on manque de matériel). Pour l'extraction, il faut garder ça en simplicité et avoir confiance en ce que dit le Cytation, la diffusion sur disque est difficilement répétable et n'est pas conseillé à faire ! C'est pourquoi il faut aussi faire confiance au phénotype pellicule dans le milieu optimisé (Absence ou beaucoup moindre chez le mutant *rhIA*- comparativement au WT). Pour les TLC, les révélateurs Orcinol et Ninhydrine sont les seuls qui présentaient des différences. Finalement, toujours garder en compte que *Burkholderia lata* produit un rhamnolipide méthylé et que malgré la grande similitude génétique (100% pour la méthyltransférase et 99% pour le reste), ce n'est pas le surfactant de *B. cenocepacia* K56-2 !

Annexe 2 : Amorces du projet (toutes commandées chez Alpha ADN, S.E.N.C)

Nom de l'amorce	Séquence	Température d'hybridation utilisée	Boîte et localisation au labo
XP_PrhlACeno-F	CGACGTAGACCTTCAGACCA	60°C	Boîte 23, A7
XP_PrhlACeno-R	CGCGAATTCGTGGCGTCGATCAACTGTG	60°C	Boîte 23, A8
XPRhIGibF	GGCTGCAGGAATTCGATATCC GACGTAGACCTTCAGACCA	60°C	Boîte 23, A9
XPRhIGibR	TCGAGGTCGACGGTATCGATG TGGCGTCGATCAACTGTG	60°C	Boîte 23, A10
XPGibTpR_F	TCCGGAGACTGTCATACGCGCTT ACTCAATGGAATAATTC	60°C	Boîte 23, A11
XPGibTpR_R	TACCGGGCCCCCCTCGAGGTCAA CAGCAATGGATAATTC	60°C	Boîte 23, A12

Alpha ADN, S.E.N.C.

225 Bridge, CP 4023
Montréal, Québec H3C 0J7
<http://www.alphaadn.com>, commandes@alphaadn.com, client@alphaadn.com
Fax : 1-800-511-3654

Date: 10/12/2018

Numéro de synthèse 646431
Nom de l'oligonucléotide: **XPRh1GibF**
Séquence (5' à 3'):
GGCTGCAGGAATTCGATATCCGACGTAGACCTTCAGACCA
OD-260: 14.7
Microgrammes: 463
Picomoles: 37672
377 µl à ajouter pour sol. de 100 µM
Contrôle interne de trityle = OK

Oligo	pmole/OD	µg/OD	Poids moléculaire du backbone [Da]
646431	2563	31.5	12290

(OD = unités d'absorption à 260 nm)

Composition du	40 -mère		
	Nucléotide	Nombre	%
	A	11	27.50
	C	11	27.50
	G	10	25.00
	T	8	20.00
	autres	0	0.00
	A+T	19	47.50
	C+G	21	52.50

Td [méthode nearest neighbor modifiée]	89.24
Tm [méthode %GC]	86.15
Tm [2*(A+T)+4*(C+G)]	N/A

Cet oligo a été dessalé sans frais supplémentaires.
SVP centrifuger le produit lyophilisé avant d'ouvrir le tube.

Alpha ADN, S.E.N.C.

225 Bridge, CP 4023
Montréal, Québec H3C 0J7
<http://www.alphaadn.com>, commandes@alphaadn.com, client@alphaadn.com
Fax : 1-800-511-3654

Date: 10/12/2018

Numéro de synthèse 646432
Nom de l'oligonucléotide: XPRh1GibR
Séquence (5' à 3'):

TCGAGGTCGACGGTATCGATGTGGCGTCGATCAACTGTG

OD-260: 16.2

Microgrammes: 520

Picomoles: 42989

430 µl à ajouter pour sol. de 100 µM
Contrôle interne de trityle = OK

Oligo	pmole/OD	µg/OD	Poids moléculaire du backbone [Da]
646432	2657	32.1	12095

(OD = unités d'absorption à 260 nm)

Composition du	39 -mère		%
	Nucléotide	Nombre	
	A	7	17.95
	C	8	20.51
	G	14	35.90
	T	10	25.64
	autres	0	0.00
	A+T	17	43.59
	C+G	22	56.41

Td [méthode nearest neighbor modifiée] 92.86
Tm [méthode %GC] 87.32
Tm [2*(A+T)+4*(C+G)] N/A

Cet oligo a été dessalé sans frais supplémentaires.
SVP centrifuger le produit lyophilisé avant d'ouvrir le tube.

Alpha ADN, S.E.N.C.

225 Bridge, CP 4023
Montréal, Québec H3C 0J7
<http://www.alphaadn.com>, commandes@alphaadn.com, client@alphaadn.com
Fax: 1-800-511-3654

Date: 24/04/2019

Numéro de synthèse 651891

Nom de l'oligonucléotide: XPG1bTpr_F

Séquence (5' à 3'):

TCCGGAGACTGTCATACGCGCTTACTCAATGGAATAATTC

OD-260: 22.2

Microgrammes: 708

Picomoles: 57756

578 µl à ajouter pour sol. de 100 µM

Contrôle interne de trityle = OK

Oligo	pmole/OD	µg/OD	Poids moléculaire du backbone [Da]
651891	2603	31.9	12255

(OD = unités d'absorption à 260 nm)

Composition du	40 -mère		
	Nucléotide	Nombre	%
	A	11	27.50
	C	10	25.00
	G	8	20.00
	T	11	27.50
	autres	0	0.00
	A+T	22	55.00
	C+G	18	45.00

Td [méthode nearest neighbor modifiée]	85.67
Tm [méthode %GC]	83.08
Tm [2*(A+T)+4*(C+G)]	N/A

Cet oligo a été dessalé sans frais supplémentaires.
SVP centrifuger le produit lyophilisé avant d'ouvrir le tube.

Alpha ADN, S.E.N.C.

225 Bridge, CP 4023
Montréal, Québec H3C 0J7
<http://www.alphaadn.com>, commandes@alphaadn.com, client@alphaadn.com
Fax: 1-800-511-3654

Date: 24/04/2019

Numéro de synthèse 651892
Nom de l'oligonucléotide: **XPG1bTpR_R**
Séquence (5' à 3'):
TACCGGGCCCCCCTCGAGGTCAACAGCAATGGATAATTC
OD-260: 24.4
Microgrammes: 788
Picomoles: 64539
645 µl à ajouter pour sol. de 100 µM
Contrôle interne de trityle = OK

Oligo	pmole/OD	µg/OD	Poids moléculaire du backbone [Da]
651892	2650	32.4	12211

(OD = unités d'absorption à 260 nm)

Composition du	40 -mère		
	Nucléotide	Nombre	%
	A	10	25.00
	C	14	35.00
	G	9	22.50
	T	7	17.50
	autres	0	0.00
	A+T	17	42.50
	C+G	23	57.50

Td [méthode nearest neighbor modifiée]	93.35
Tm [méthode %GC]	88.20
Tm [2*(A+T)+4*(C+G)]	N/A

Cet oligo a été dessalé sans frais supplémentaires.
SVP centrifuger le produit lyophilisé avant d'ouvrir le tube.

Annexes 3 : Cartes des plasmides utilisés

Created with SnapGene®

