Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

Étude de la production de rhamnolipides par *Burkholderia*

Par
Danielle Dubeau

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Réjean Beaudet INRS- Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Dao Nguyen Université McGill
Directeur de recherche	François Lépine INRS- Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Danielle Dubeau, 2009

Résumé

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent d'excellentes propriétés tensioactives. Grâce à leur biodégradabilité et à leur absence de toxicité, ce sont des candidats très prometteurs comme alternative aux surfactants synthétiques pour une variété d'utilisations industrielles ainsi que la biorestauration de sols contaminés. Les rhamnolipides ont été exhaustivement étudiés chez *Pseudomonas aeruginosa* à cause de leurs rôles dans certains comportements multicellulaires de cette bactérie, tels le développement de biofilm, la motilité « swarming » ainsi que comme facteurs de virulence. Nous avons découvert chez *B. pseudomallei*, un pathogène important, ainsi que chez *B. thailandensis*, une espèce génétiquement similaire à cette dernière mais non-pathogène, des gènes orthologues à *rhlA, rhlB* et *rhlC*, qui sont responsables de la production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. De plus, nous avons aussi retrouvé des orthologues de ces gènes chez *B. cenocepacia* et *B. ambifaria*, deux espèces pathogènes opportunistes que l'on retrouve plus particulièrement chez les individus atteints de fibrose kystique. Contrairement à *P. aeruginosa*, ces quatre espèces contiennent les trois gènes nécessaires à la production de rhamnolipides dans un même opéron. De plus, chez *B. pseudomallei* et *B. thailandensis*, on a constaté qu'il existe deux copies identiques paralogues de cet opéron. Nous avons investigué la production de rhamnolipides par ces espèces bactériennes dans différentes conditions de culture, incluant des milieux riches et minimaux ainsi qu'avec différentes sources de carbone.

Deux des espèces de *Burkholderia* étudiées, *B. pseudomallei* et *B. thailandensis,* sont capables de produire des rhamnolipides similaires à ceux produits par *P. aeruginosa,* sauf qu'ils possèdent des chaînes plus longues d'acides gras hydroxylés en position 3. Le contenu en dirhamnolipides par rapport aux monorhamnolipides est beaucoup plus élevé chez *Burkholderia* que chez *Pseudomonas*. Cependant, nous n'avons pas encore trouvé de conditions favorables pour la production de rhamnolipides chez *B. cenocepacia* et *B. ambifaria*.

En inactivant les deux copies du gène *rhlA* chez *B. thailandensis*, lesquels sont responsables de la synthèse des précurseurs des rhamnolipides, on a démontré que les deux opérons *rhl* sont fonctionnels quoiqu'une des deux copies semble contribuer de façon prédominante à la production totale. Finalement, avec un double mutant *rhlA* qui est incapable de produire des rhamnolipides, on a démontré que la motilité « swarming » de *B. thailandensis* dépend de la fonctionnalité de ses deux opérons *rhl*.

Danielle Dubeau
Étudiante

François Lépine
Directeur de recherche

Remerciements

Mes premiers remerciements vont évidement à mon directeur de recherche, François Lépine, pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire de recherche pendant ces deux dernières années. Je suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée quant à la manipulation de ton spectromètre de masse ! Je te remercie pour nos réunions du vendredi après-midi hebdomadaires et pour tes mots d'encouragements très appréciés.

Je voudrais aussi bien sûr remercier Éric Déziel pour m'avoir acceptée comme une de ses propres étudiants et de m'avoir permis de manipuler dans son laboratoire. Je te remercie pour tout ton support, tes idées et aussi pour les nombreuses fois que je suis arrivée à ta porte avec une question et que tu prenais le temps de jaser avec moi jusqu'à ce qu'on trouve une solution. Merci.

À tous mes collègues de labo, Marie-Christine, Ludo, Valérie, Martin, Julien, Julie et tous les membres du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement, merci pour tous vos conseils mais aussi pour les sorties de groupe à la Banquise et nos fameuses soirées Bar-B-Q.

À ma maman, à ma sœur, à mon frère et à mon père, merci de votre confiance en moi et de votre encouragement durant mes moments d'ennuis et de faiblesse.

Finalement, à mon amour Jean-Philippe, nous nous sommes rencontrés au tout début de notre maîtrise et tu as été pour moi un support qui m'a permis de surmonter tous les moments difficiles qui nous ont fait face au cours de ces dernières années. On s'est compris l'un l'autre. Je te remercie pour ton amour, ta compréhension, ton support et surtout ta tendresse. Je t'aime.

Table des matières

Résumé ..... **II**

Remerciements ..... **IV**

Table des matières ..... **V**

Liste des figures ..... **IX**

Liste des tableaux ..... **XII**

Liste des abréviations ..... **XIII**

Introduction **1**

Chapitre I - Revue de littérature **4**

1.1 Les surfactants **5**

1.1.1 La concentration micellaire critique 5

1.2 Les biosurfactants **7**

1.2.1 Origines et caractéristiques des biosurfactants 7

1.2.1.1 Rôles des biosurfactants chez les microorganismes producteurs 7

1.2.2 Avantages de l'utilisation des biosurfactants et applications commerciales potentielles 8

1.2.3 Types de biosurfactants 9

1.2.4 Facteurs affectant la production de biosurfactants 10

1.3 Les rhamnolipides **11**

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa* 11

1.3.1.1 Autres espèces de *Pseudomonas* qui peuvent produire des rhamnolipides 11

1.3.2 Systèmes de régulation chez *P. aeruginosa* – Quorum Sensing 12

1.3.3 Biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* 15

1.3.4 Rôles des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* 19

1.3.4.1 Biodégradation d'hydrocarbures 19

1.3.4.2 Formation et maintien de biofilms 20

1.3.4.3 Swarming 20
1.3.4.4 Facteurs de virulence 21

1.4 *Burkholderia* 22

1.4.1 Le genre *Burkholderia* 22
1.4.2 Les cas de *B. pseudomallei, B. mallei et B. thailandensis* 26
1.4.3 Les infections par *Burkholderia* et la fibrose kystique 27
1.4.4 Le QS chez le BCC 28
1.4.5 Le QS chez *B. pseudomallei, B. mallei et B. thailandensis* 29
1.4.6 Les biosurfactants chez les *Burkholderia* 32

1.5 *Galleria mellonella* comme hôte alternatif pour l'étude de virulence 33

1.5.1 Modèles d'infections couramment utilisées pour l'étude de la virulence chez *Burkholderia* 33
1.5.2 Utilisation de *G. mellonella* comme hôte alternatif 34
1.5.3 Étude de *Burkholderia* à l'aide de G. *mellonella* 34

Chapitre II - Article scientifique 36

2.1 Contribution des auteurs à l'article 37

2.1.1 Attestation des co-auteurs 37

2.2 Accusé de réception 41

2.3 Précisions sur la présentation de l'article 42

2.4.1 Abstract 44
2.4.2 Background 45
2.4.3 Results 47
2.4.4 Discussion 51
2.4.5 Conclusions 55
2.4.6 Methods 56
2.4.7 Author's Contributions 59
2.4.8 Acknowledgements 60
2.4.9 References 60
2.4.10 Figures and tables 61

Chapitre III - Méthodologie et résultats supplémentaires 70

3.1 Résumé des souches bactériennes et des mutants utilisés au cours du projet 71

3.2 Méthodes directes et indirectes utilisées pour détecter la présence de rhamnolipides 74

3.2.1 Tests d'abaissement de la tension de surface.....74
3.2.2 Analyses par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (CL/SM).....74

3.3 Études de la production de rhamnolipides chez quelques espèces de *Burkholderia*.....76

3.3.1 Identification d'espèces de *Burkholderia* possédant les gènes de biosynthèse des rhamnolipides 76
3.3.2 Le cas de *B. mallei*.....76
3.3.3 Essais de divers conditions et milieux de culture pour la production de rhamnolipides par les espèces *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*.....77
3.3.3.1 Milieu sputum artificiel.....78
3.3.4 Essais swarming de quelques souches de *B. cenocepacia*.....78
3.3.5 Études génétiques approfondies chez *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*.....80

3.4 Étude de l'efflux des rhamnolipides chez *B. thailandensis* et *P. aeruginosa* 81

3.5 Étude de la production de rhamnolipides *in vivo* à l'aide d'un modèle d'infection alternatif – *Galleria mellonella* 83

3.6 Étude de la virulence des rhamnolipides produits par *B. thailandensis* à l'aide de *G. mellonella*.....85

3.7 Étude de l'effet des rhamnolipides issues de *P. aeruginosa* sur la bactérie *B. thailandensis* 87

3.8 Étude d'une co-culture de *P. aeruginosa rhlA-* et *rhlC-*.....89

3.9 Étude du lien QS et la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis* 91

3.9.1 Implication du système HMAQ.....91
3.9.2 Effet de la production de rhamnolipides sur les quantités de HMAQs 93
3.9.3 Implication des systèmes *btaR/btaI* 94

Chapitre IV - Discussion de l'ensemble des résultats.....96

4.1 Présence d'orthologues *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* chez les membres de *Burkholderia* 97

4.2 Production de rhamnolipides chez *B. thailandensis* – Biosynthèse, régulation et caractérisation de ces rhamnolipides 99

4.3 Efflux des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* et les espèces *Burkholderia* 100

4.4 Les rhamnolipides en tant que facteurs de virulence 101

4.5 Utilisation de rhamnolipides exogènes pour la production *de novo* endogène 101

Chapitre V - Conclusions et perspectives 103

Annexe 1 - Milieux de cultures 107

Références 110

Liste des figures

Figure 1. Schématisation de la concentration micellaire critique (CMC) d'un surfactant donné. La CMC d'un surfactant correspond à la concentration à laquelle l'interface air/eau en est saturée et il y a formation spontanée de micelles. 6

Figure 2. Représentation schématisée du système de régulation densité-dépendante typique, le système Lux chez *V. fisheri*. 13

Figure 3. Résumé des trois systèmes de QS retrouvés chez *P. aeruginosa* : structures chimiques des autoinducteurs respectifs à chacun des systèmes et exemples de gènes régulés par ces systèmes. 14

Figure 4. Premier modèle de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. (Burger *et al.*, 1963; Ochsner *et al.*, 1994a) 16

Figure 5. Modèle proposé pour la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* par l'entremise du système QS RhlR/RhlI (Ochsner et Reiser, 1995). 17

Figure 6. Biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* tel que décrite par Zhu et Rock (2008). 19

Figure 7. Arbre phylogénétique de l'ADNr 16s démontrant les ressemblances entre les différentes espèces de *Burkholderia* ainsi qu'avec les genres bactériens reliés. Tiré de Coenye et Vandamme (2003). 25

Figure 8. Comparaison de l'opéron *pqsABCDE* chez *P. aeruginosa* PA14 et de l'opéron *hmqABCDEFG* chez *B. ambifaria* AMMD. Les valeurs représentent les identités/similarités entre les protéines de chacun. Figure tirée de Vial *et al*, 2008. 32

Figure 9. Genetic arrangement of *rhlA*, *rhlB* and *rhlC* in the genomes. 61

Figure 10. Congener analysis of rhamnolipids from *B. thailandensis*. 62

Figure 11. Production of the most abundant dirhamnolipids in a *B. pseudomallei* 1026b culture. 63

Figure 12. Surface tension and CMC value. 64

Figure 13. Rhamnolipid production by single *rhlA* mutants 65

Figure 14. Swarming phenotype restoration within the *rhlA* mutants 66

Figure 15. Swarming de trois souches de *B. cenocepacia* sur milieu NB + 0.5% dextrose + 0.5% agar. Pétris placés à 37°C pendant 5 jours. A) *B. cenocepacia* CEP0511* B) *B. cenocepacia* CEP0565 C) *B. cenocepacia* LMG19240. 79

Figure 16. Alignement des regroupements de gènes *rhl* présents chez *B. thailandensis* E264, *B. cenocepacia* AU 1054 et *B. ambifaria* AMMD (http://www.burkholderia.com). Il est possible de voir ici qu'il y a présence d'un gène additionnel (en bleu) en *aval* des gènes *rhlA* chez *B. cenocepacia* et *B. ambifaria*. Ce gène a une fonction prédite d'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase putative. 80

Figure 17. Niveaux de production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{10}-C_{10}) par la souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14 et du mutant *PA14_49750-*. 82

Figure 18. Suivi de la mortalité des *Galleria mellonella* suite à leur infection avec la souche sauvage de *B. thailandensis* ainsi que des différents mutants *rhlA-*. 86

Figure 19. Décompte UFC pour chacun des inoculums initiaux injectés. 86

Figure 20. Effet des HAAs, monorhamnolipides et dirhamnolipides à chaine courte produits par *P. aeruginosa* sur des cellules en swarming de *B. thailandensis*. A) *P. aeruginosa fliC-* B) *P. aeruginosa rhlA-* C) *P. aeruginosa rhlB-* D) *P. aeruginosa rhlC-*. À gauche des pétris, *P. aeruginosa* et à droite, *B. thailandensis* 88

Figure 21. Production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{10}-C_{10}) d'un triplicata de co-cultures des mutants *rhlA-* et *rhlC-* de *P. aeruginosa* PA14 après 6 jours. 90

Figure 22. Production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{14}-C_{14}) d'un triplicata de cultures de la souche sauvage de *B. thailandensis* E264 et de son mutant *hmqA-*. 92

Figure 23. Concentrations des principaux HMAQs produits par la souche sauvage de *B. thailandensis* et ses mutants *rhlA*. 93

Figure 24. Concentration du Rha-Rha-C_{14}-C_{14} dans des cultures de la souche sauvage de *B. thailandensis* ainsi que dans divers mutants des systèmes BtaR/BtaI. 95

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de microorganismes et du type de biosurfactants qu'ils produisent. 10

Tableau 2. Espèces de *Burkholderia* communément associées aux infections humaines. Tableau adapté de LiPuma, 2007. 24

Tableau 3. Résumé des principales molécules signal produites par les trois synthases *luxI* retrouvés chez *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis*. 31

Table 4. Primers used in this study. 67

Table 5. Predicted functions of the remaining ORFs. 68

Table 6. Maximal production and relative abundance of the HAAs and rhamnolipids produced by *B. thailandensis* E264. 69

Tableau 7. Identification des souches utilisées au cours du projet ainsi que leurs provenances. 72

Tableau 8. Listes de mutants utilisés au cours du projet. 73

Tableau 9. Ions pseudomoléculaires correspondant aux principaux congénères à chaînes courtes et à chaînes longues retrouvés chez *Pseudomonas* et *Burkholderia*, respectivement. 75

Liste des abréviations

AI	Autoinducteur
BCC	« *Burkholderia cepacia* complex »
BHI	« Brain Heart Infusion »
CL	Chromatographie liquide
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CL/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CMC	Concentration micellaire critique
DO	Densité optique
FK	Fibrose kystique
HAA	Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinoline
HHQ-D4	4-hydroxy-2-heptylquinoline tetradeutéré
HMAQ	4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinoline
HSL	Homosérine lactone
NB	« Nutrient Broth »
O/N	« Overnight »
ORF	« Open Reading Frame », Cadre de lecture ouvert
PHA	Acide polyhydroxyalcanoïque
PQS	3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, « Pseudomonas quinolone Signal »
QS	« Quorum Sensing »
SM	Spectrométrie de masse
TDP-rhamnose	Thymidinediphosphorhamnose
TSB	« Tryptic Soy Broth »
UFC	Unités formatrices de colonies

C_4-HSL	*N*-butyroyl-HSL
C_6-HSL	*N*-hexanoyl-HSL
C_8-HSL	*N*-octanoyl-HSL
C_{10}-HSL	*N*-décanoyl-HSL
3-oxo-C_{12}-HSL	*N*-3-oxo-dodécanoyl-HSL
3OC_{14}-HSL	*N*-3-oxo-tétradécanoyl-HSL
3OHC_4-HSL	*N*-3-hydroxy-butyroyl-HSL
3OHC_9-HSL	*N*-3-hydroxy-nonanoyl-HSL
3OHC_{12}-HSL	*N*-3-hydroxy-dodécanoyl-HSL
3OHC_8-HSL	*N*-3-hydroxy-octanoyl-HSL
3OHC_{10}-HSL	*N*-3-hydroxy-décanoyl-HSL

Introduction

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt quant à leurs nombreuses applications potentielles dans diverses industries. Produits par des espèces bactériennes très différentes l'une de l'autre, les formes que peuvent prendre ces biosurfactants sont d'autant variées. Leurs propriétés tensio-actives font d'eux d'excellents candidats pour la bioremédiation des sols puisque ces molécules sont non-toxiques et biodégradables (Kosaric, 1992; Kitamoto *et al.*, 2002; Mulligan, 2005).

Les rhamnolipides sont une classe de biosurfactants qui a été exhaustivement étudiée depuis sa découverte en 1949 par Jarvis et Johnson (Jarvis et Johnson, 1949). Ces molécules sont des glycolipides composés d'un dimère d'acide 3-hydroxyalcanoïque dont les chaînes d'acide gras hydroxylées en position 3 varient en longueur. Ce dimère est finalement couplé à une ou deux molécules de rhamnose. Produites principalement par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie Gram négative ubiquitaire, pathogène opportuniste, les rhamnolipides sont des biosurfactants qui ont été étudiés extensivement tant au niveau de leur biosynthèse par l'entremise des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*, qu'aux conditions de culture pour une production optimale et qu'au développement de méthodes de détection spécifiques (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2003; Zhu et Rock, 2008). Une gamme de congénères a été établie et caractérisée par plusieurs équipes de chercheurs. Plus récemment, l'implication des rhamnolipides dans des processus multicellulaires tel le développement des biofilms, dans la motilité de type « swarming » ainsi que comme facteurs de virulence, a donné lieu a un intérêt renouvelé pour ces molécules (Yu *et al.*, 1998; Davey *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Lequette et Greenberg, 2005; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007; George *et al.*, 2009).

Jusqu'à très récemment, la production de rhamnolipides n'était décrite que chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais de nos jours d'autres espèces du même genre ont été trouvées capable de produire ce type de biosurfactants (Tuleva *et al.*, 2002; Gunther *et al.*, 2005; Vasileva-Tonkova *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2008). Deux espèces distinctes appartenant au genre

Burkholderia ont aussi été rapportées dans la littérature comme pouvant produire des rhamnolipides (Häußler *et al.*, 1998; Andrä *et al.*, 2006). Cependant, ces études n'ont décrit qu'un seul congénère et ce, sans vraiment poursuivre la caractérisation de ce dernier, se concentrant plutôt sur la toxicité de cette molécule. Le genre bactérien *Burkholderia* était auparavant inclus dans le genre *Pseudomonas* et la possibilité qu'elle possède aussi les gènes de biosynthèse des rhamnolipides n'est donc pas étonnante. On retrouve chez les Burkholderiacae plusieurs espèces pathogènes ainsi que d'autres qui semblent plutôt bénéfiques aux plantes. Certaines espèces sont aussi retrouvées en clinique, plus précisément dans les poumons des personnes atteintes de la fibrose kystique, en cohabitation avec *P. aeruginosa* (Yabuuchi *et al.*, 1992; Venturi *et al.*, 2004; Eberl, 2006; LiPuma, 2007; Stoyanova *et al.*, 2007; George *et al.*, 2009).

Les objectifs spécifiques du présent projet consistent à trouver une ou plusieurs espèces de *Burkholderia* qui dans un premier temps possèdent des gènes de biosynthèse de rhamnolipides homologues à ceux déjà connus chez *P. aeruginosa*, et ce par recherches bioinformatiques. Suite à la découverte qu'il existe deux copies identiques des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* nous évaluerons la fonctionnalité de ces paralogues. Par la suite, nous vérifierons que ces souches sont capables de produire des rhamnolipides et nous les caractériserons par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectre de masse (CL/SM). Les étapes suivantes seront d'optimiser les conditions de production de ces molécules en utilisant différentes sources de carbone pour leur synthèse et d'étudier les phénotypes associés à leur production et finalement d'étudier leur voie de biosynthèse. La motilité « swarming » de *B. thailandensis* sera également étudiée. Tous ces points sont abordés en détails dans le présent mémoire sous forme de volets spécifiques.

Cinq espèces de *Burkholderia* ont été identifiées comme possédant les trois gènes de biosynthèse des rhamnolipides, soit *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*. De ces cinq, seulement le pathogène *B. pseudomallei* et l'espèce génétiquement très proche mais non-infectieuse *B. thailandensis*, ont produit des

rhamnolipides en laboratoire. Pour le moment, seulement *B. pseudomallei* et *B. plantarii* sont connus pour la production d'un seul congénère de rhamnolipide. Les résultats présentés démontrent que *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* produisent une gamme de congénères dont les chaînes des acides gras hydroxylées en position 3 sont d'une longueur qui n'a jamais été reportée dans la littérature. Ces chaînes longues confèrent à ces rhamnolipides des propriétés tensio-actives très intéressantes.

En résumé, ces travaux ont permis l'identification d'une nouvelle espèce bactérienne capable de produire des rhamnolipides ainsi que la caractérisation de ces derniers au niveau structurel et de certaines de leurs propriétés physico-chimiques. De plus, des congénères autres que celui déjà rapporté pour *B. pseudomallei* ont été trouvés.

Chapitre I - Revue de littérature

1.1 Les surfactants

Les surfactants sont des composés amphiphiles ayant des propriétés tensioactives. Ils ont donc comme effet de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Ces molécules sont formées d'une partie hydrophobe ainsi qu'une partie hydrophile qui leurs confèrent une affinité particulière pour les interfaces air/eau ou eau/huile (Mulligan, 2005). L'extrémité apolaire des surfactants est normalement composée d'une chaîne d'acides gras tandis que l'extrémité polaire peut être formée à partir de sucres, d'acides aminés, de peptides cycliques, de phosphate, d'acide carboxylique ou bien d'alcool (Rahman et Gakpe, 2008). L'usage des surfactants est très varié. On les retrouve dans les détergents, les agents moussants, les agents mouillants, les agents dispersants ainsi que dans les émulsifiants. On peut noter ici que toutes ces formulations sont généralement à base de composés chimiques (Kosaric, 1992; Singh *et al.*, 2007).

1.1.1 La concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) est une caractéristique spécifique de chaque surfactant et est un des paramètres utilisés pour la quantification de l'efficacité de ces derniers dans certains types d'utilisation. Cette valeur représente la concentration à laquelle l'interface en question est complètement saturée en surfactants ce qui entraine la formation spontanée de micelles (Figure 1). Plus précisément, la CMC est la concentration minimale d'un surfactant requise pour atteindre la valeur de tension de surface, ou interfaciale, la plus basse (Lin, 1996). De ce fait, plus la valeur de CMC d'un surfactant est basse, plus que celui-ci est efficace puisqu'une concentration moindre est nécessaire pour abaisser la tension de surface contrairement à un surfactant dont la CMC est plus haute (Becher, 1965).

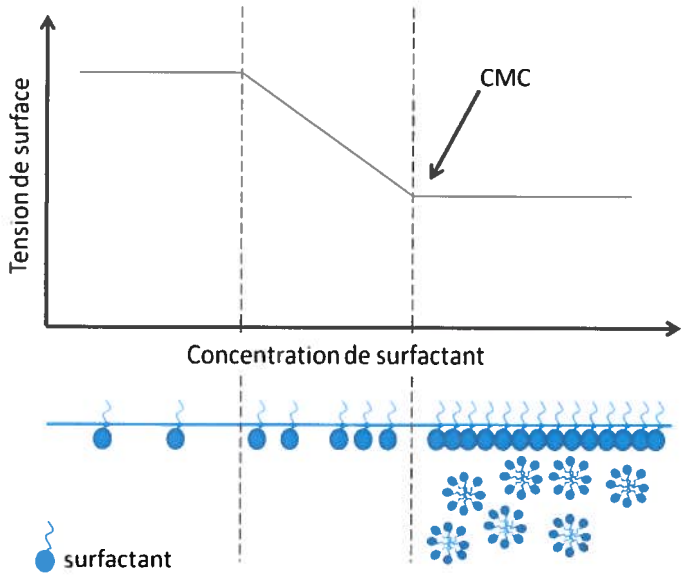


Figure 1. Schématisation de la concentration micellaire critique (CMC) d'un surfactant donné. La CMC d'un surfactant correspond à la concentration à laquelle l'interface air/eau en est saturée et il y a formation spontanée de micelles.

1.1.1.1 Facteurs affectant la CMC

Comme mentionné ci-haut, la capacité de diminuer la tension interfaciale et la micellization en solution sont les caractéristiques les plus intéressantes chez un surfactant. Plusieurs facteurs peuvent venir influencer cette propriété. Premièrement, la température joue directement sur la CMC. Dans le cas des éthers de dodécylpolyoxyéthylènes, il a été démontré par Murata et son équipe que les valeurs de CMC diminuent avec une augmentation de température (Murata *et al.*, 1997). D'autres études portant sur les effets de la température et du pH sur la formation de micelles ont aussi été effectuées (Tokiwa et Ohki, 1968; Pandit et Strykowski, 1989; Sugihara *et al.*, 2002). Entre autres, une étude sur l'effet du pH sur la CMC du sel de sodium du dodécylsulphate (SDS) a démontré qu'à bas pH, la valeur de CMC diminue tandis qu'à haut pH, elle reste constante (Rahman et Brown, 1983).

Un autre facteur qui affecte grandement le potentiel d'un surfactant à abaisser la tension de surface est la longueur de la chaîne alkyle qui le compose. Il a été démontré par une équipe

travaillant sur des dérivés de sophorolopides qu'une augmentation dans le nombre de carbone d'une chaîne a un effet direct sur la CMC (Zhang *et al.*, 2004). En effet, une augmentation du nombre de groupes CH_2 entraine une augmentation de l'hydrophobicité, ce qui facilite ainsi la formation des micelles.

1.2 Les biosurfactants

1.2.1 Origines et caractéristiques des biosurfactants

Une alternative à l'utilisation d'agents tensioactifs chimiques est l'emploi de biosurfactants. Ces molécules comportent les mêmes caractéristiques intéressantes qu'on observe chez les surfactants synthétiques mais elles sont issues de microorganismes comme des bactéries, des levures ou mêmes des mycètes. Ces microorganismes vont souvent produire un type de biosurfactant qui est propre à leur genre ou même à leur espèce.

1.2.1.1 Rôles des biosurfactants chez les microorganismes producteurs

Une des nombreuses caractéristiques associées aux biosurfactants est qu'ils possèdent souvent une activité biologique (Kitamoto *et al.*, 2002). Par exemple, les biosurfactants présentent souvent une activité antibactérienne ou antivirale. Ces activités peuvent être utiles pour la défense du microorganisme. Les biosurfactants peuvent parfois être considérés comme des facteurs de virulence visant à affaiblir les défenses d'un hôte. De plus, on retrouve aussi des activités cytolytiques associées aux biosurfactants (Cameotra et Makkar, 2004). Plusieurs bactéries pouvant naturellement dégrader des hydrocarbures produisent également des biosurfactants (Koch *et al.*, 1991; Miller, 1995; Déziel *et al.*, 1996). Il existe plusieurs études qui démontrent que ces molécules tensio-actives sont des agents émulsifiants qui permettent d'augmenter la biodisponibilité des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau, ce qui facilite l'accès à des substances nutritives pour ces microorganismes permettant une amélioration de certains procédés de bioremédiation (Bognolo, 1999; Ron et Rosenberg, 2002; Singh *et al.*, 2007). Un autre rôle naturel des biosurfactants est associé à la régulation de l'attachement et

du détachement des microorganismes aux surfaces lors de la formation d'un biofilm. Ces biofilms permettent l'établissement de communautés bactériennes protégées (Neu, 1996; Rosenberg et Ron, 1999).

1.2.2 Avantages de l'utilisation des biosurfactants et applications commerciales potentielles

Les biosurfactants sont d'excellents candidats pour de nombreuses applications commerciales puisqu'ils possèdent les avantages d'être des composés biodégradables et relativement peu toxiques, propriétés que les surfactants chimiques ne possèdent qu'à un degré moindre (Mulligan, 2005). De plus, en les comparant aux surfactants synthétiques, les biosurfactants possèdent souvent des CMC plus petites et donc plus intéressantes d'un point de vue économique lorsqu'on envisage les applications industrielles potentielles.

Dans le domaine de la biorestauration des sols où l'utilisation d'émulsifiants chimiques est très répandue, l'application de biosurfactants est très envisageable. Les biosurfactants peuvent être produits par les microorganismes à partir de sources de carbones peu dispendieuses, ce qui peut diminuer les coûts de production. De plus, grâce à certains groupes fonctionnels spécifiques, les biosurfactants possèdent une certaine spécificité vis-à-vis divers types de polluants, ce qui peut être intéressant dans le cas de bioremédiation de certains polluants (Rahman et Gakpe, 2008). Notamment, le rôle de certains biosurfactants a été étudié dans la solubilisation et le métabolisme des dérivés pétroliers tels le phénanthrène, le pyrène et le fluorène dans une optique d'un procédé de biodégradation, suite à un déversement (Bordoloia et Konwar, 2009). Une étude récente a démontré pour la première fois l'effet de biosurfactants, plus précisément des rhamnolipides, sur la dégradation du chlorpyrifos, un pesticide organophosphaté. L'addition de ces biosurfactants a permis une dégradation de 98% du chlorpyrifos, tandis qu'un rendement de seulement 84% a été observé en absence de rhamnolipide (Singh *et al.*, 2009).

À cause des nombreux avantages énumérés ci-haut, les biosurfactants peuvent avoir des applications commerciales pour la bioremédiation d'eau ou de sol contaminé par des huiles

et/ou des hydrocarbures, pour la lixiviation accrue de ces derniers dans des sols contaminés, et pour le remplacement de solvants organiques comme les agents nettoyants dans certains usages commerciaux et industriels. De plus, les biosurfactants peuvent faire partie de la formulation de détergents, d'herbicides et de pesticides et finalement dans la formation d'émulsifiants stables dans les industries cosmétiques et alimentaires (Lin, 1996; Rosenberg et Ron, 1999; Lourith et Kanlayavattanakul, 2009).

1.2.3 Types de biosurfactants

Les biosurfactants peuvent appartenir à différentes classes de composés telles que les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les acides gras ou même les lipides neutres (Georgiou *et al.*, 1992; Mulligan, 2005). Les biosurfactants couvrent donc une vaste gamme de poids moléculaire. Les glycolipides et les lipopeptides présentent des poids moléculaires relativement bas en comparaison avec celui des polysaccharides amphipatiques, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines et des mélanges complexes de polymères biologiques. Les biosurfactants à poids moléculaire faible sont surtout utilisés pour abaisser la tension de surface, tandis que ceux à poids moléculaire élevé servent plutôt à la stabilisation des émulsions (Rosenberg et Ron, 1999).

Les glycolipides regroupent les rhamnolipides, les tréhalolipides, les sophorolipides et les cellobiololipides. Ce groupe est relativement plus étudié puisque les rendements de production associés à ce type de biosurfactants sont beaucoup plus élevés que chez d'autres biosurfactants et que leurs propriétés moussantes sont aussi très intéressantes (Kitamoto *et al.*, 2002; Gautam et Tyagi, 2006; Hirata *et al.*, 2009). Le tableau 1 montre quelques exemples de microorganismes et le biosurfactant respectif qu'ils produisent.

Tableau 1. Exemples de microorganismes et du type de biosurfactants qu'ils produisent.

Espèce bactérienne	Biosurfactant produit	Référence
Pseudomonas aeruginosa	Rhamnolipide	(Schenk *et al.*, 1995)
Pseudomonas fluorescens	Rhamnolipide	(Gunther *et al.*, 2005)
Bacillus licheniformis	Lipopeptide	(Yakimov *et al.*, 1995)
Candida bombicola	Sophorolipide	(Solaiman *et al.*, 2004)
Torulopsis bombicola	Sophorolipide	(Inoue et Ito, 2004)
***Acinetobacter* sp.**	Phospholipide	(Makula *et al.*, 1978)
***Rhodococcus* sp.**	Tréhalolipide	(Lang et Philp, 1998)
Bacillus subtilis	Surfactin	(Arima *et al.*, 1968)
Serratia rubidaea	Rubiwettin	(Matsuyama *et al.*, 1990)
Serratia marcescens	Serrawettin	(Matsuyama *et al.*, 1985)

1.2.4 Facteurs affectant la production de biosurfactants

Plusieurs facteurs contribuent à la production de biosurfactants comme la source de carbone et de nombreux paramètres de cultures comme le pH, la température, l'agitation et l'oxygénation du milieu. De plus, la salinité, c'est-à-dire les concentrations en ions multivalents (Mg, Ca, K, Na et éléments traces), les concentrations de phosphate et d'azote ainsi que les sources de ces derniers peuvent influencer la production de biosurfactants. Ces paramètres peuvent jouer de façon positive ou négative sur la production et varient de façon importante entre les espèces (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Rahman *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2005).

1.3 Les rhamnolipides

Comme mentionné plus haut, les rhamnolipides sont un biosurfactant de type glycolipidique. Ces molécules tensio-actives appartiennent à la classe de biosurfactant à faible poids moléculaire et leur production chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été exhaustivement étudiée. Le présent volet présente en détail les caractéristiques de ces molécules. La principale bactérie qui les produit, la voie de biosynthèse, la régulation génétique ainsi que les propriétés et les rôles des rhamnolipides sont abordés ci-dessous.

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négative faisant partie de la famille des *Pseudomonadaceae* (Winslow *et al.*, 1920). Cette γ-protéobactérie est un bacille motile et ubiquitaire. Même si elle est retrouvée le plus souvent dans l'environnement (eau, sol, végétation), elle est aussi considérée comme un pathogène opportuniste important, infectant communément les personnes immunodéprimées. De plus, *P. aeruginosa* est maintenant la cause majeure d'infections nosocomiales et sa présence est aussi très commune chez les personnes atteintes de la fibrose kystique (Govan et Nelson, 1992; Van Delden et Iglewski, 1998; Yu *et al.*, 1998).

1.3.1.1 Autres espèces de *Pseudomonas* qui peuvent produire des rhamnolipides

En plus de *P. aeruginosa*, qui est l'espèce la plus reconnue pour la production de rhamnolipides, il y a d'autres espèces appartenant à cette famille de bactérie qui sont capables d'en produire. En 2002, *P. putida*, a été isolée d'eau de rejets industriels pour sa capacité de biodégrader des hydrocarbures ainsi que pour sa production de biosurfactants lesquels furent identifiées comme étant des rhamnolipides (Tuleva *et al.*, 2002). Par la suite, en 2004, la production de rhamnolipides par *P. chlororaphis*, une bactérie non-pathogène, a aussi été décrite (Gunther *et al.*, 2005). Cette découverte est très intéressante au point de vue de la commercialisation de l'utilisation des rhamnolipides puisque *P. aeruginosa* est un pathogène

opportuniste et l'emploi à des fins industrielles et commerciales de ses produits extracellulaires est un sujet controversé. *P. chlororaphis* est donc une candidate intéressante à des fins de production industrielle de rhamnolipides. Plus récemment, la production de biosurfactants glycolipidiques par *P. fluorescens* HW-6 a été décrite (Vasileva-Tonkova *et al.*, 2006). Finalement, il est à noter ici qu'au moins un autre type de biosurfactants a été observé chez les *Pseudomonas*. C'est le cas d'un lipopeptide cyclique, la viscosine, qui est produit par *P. libanensis* M9-3 (Saini *et al.*, 2008).

Finalement, la production de rhamnolipides chez deux autres espèces de bactéries n'appartenant pas à la famille des *Pseudomonas* a aussi été rapportée dans la littérature. Ces deux espèces appartiennent à la famille des *Burkholderia* et seront décrites plus loin dans le présent chapitre.

1.3.2 Systèmes de régulation chez *P. aeruginosa* – Quorum Sensing

Plusieurs espèces de bactéries possèdent des systèmes de régulation génétique basés sur la densité des cellules dans le milieu. Ces systèmes sont composés de différentes molécules signal, appelées autoinducteurs (AI), et de récepteurs spécifiques à celles-ci. Ces systèmes de régulation servent plus précisément à la coordination des comportements de la population bactérienne. Cette régulation densité-dépendante est nommé « Quorum Sensing » (QS) et est constituée normalement d'une synthase de l'autoinducteur (I) et d'un régulateur transcriptionnel (R). Ces derniers sont nommés à partir du système Lux qui a été découvert initialement chez l'espèce *Vibrio fisheri (Photobacterium fischeri)*. Le système LuxRI contrôle la bioluminescence de ce microorganisme (Nealson, 1977; Dunlap, 1999). De façon générale, l'AI est produit de façon normale, c'est-à-dire à un niveau basal, chez un microorganisme qui possède un tel système QS. Lorsque ce signal atteint une concentration seuil par l'action d'une population bactérienne élevée, il peut se complexer à son récepteur spécifique et déclencher la régulation, soit positive ou négative, de certains gènes. De plus, cette activation déclenche aussi la transcription de l'AI. La boucle de régulation positive qui constitue ce système est une caractéristique typique et commune d'un système de QS (Figure 2). Le système de QS Lux est

demeuré la base de la notation de la grande majorité des systèmes QS qui sont régulés de cette façon.

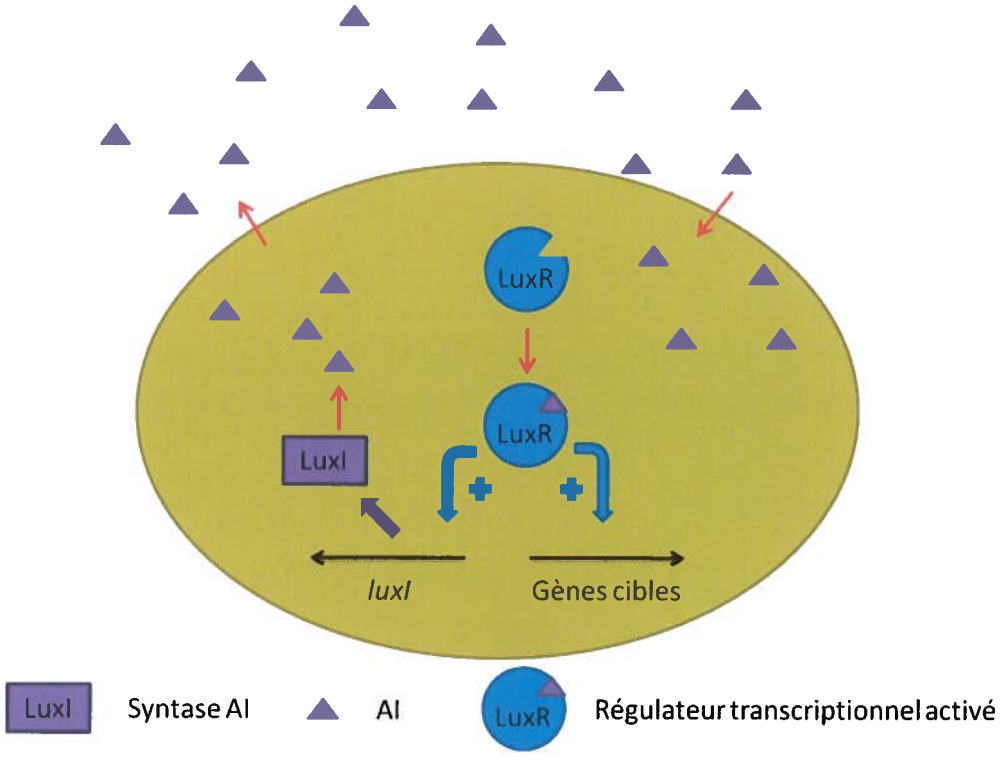


Figure 2. Représentation schématisée du système de régulation densité-dépendante typique, le système Lux chez *V. fisheri*.

Les premières molécules signal décrites sont des homosérines lactones (HSL). Chez *P. aeruginosa*, les principales HSL sont le *N*-3-oxo-dodécanoyl-HSL (3-oxo-C_{12}-HSL) et le *N*-butyroyl-HSL (C_4-HSL). La bactérie *P. aeruginosa* bénéficie d'au moins trois systèmes complexes de régulation du quorum sensing. Le premier est le système LasRI tandis que la deuxième est retrouvée dans le système RhlRI. Un troisième système distinct de ces deux est aussi présent chez *P. aeruginosa* et est contrôlé par le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline ou « Pseudomonas Quinolone Signal » (PQS). Ce système régule la biosynthèse des 4-hydroxy-2-alkylquinolines

(HAQs) par l'entremise d'une série de gènes retrouvés en opéron (*pqsABCDE*) et du régulateur transcriptionnel Mvfr (PqsR) (Déziel *et al.*, 2004; Häußler et T., 2008; Dekimpe et Déziel, 2009).

Le rôle de ces trois systèmes est de contrôler l'expression de plusieurs gènes dont plusieurs sont impliqués dans la biosynthèse de facteurs de virulence comme des élastases, des protéases et la pyocyanine (Van Delden et Iglewski, 1998). De plus, une certaine hiérarchie est présente chez ces trois systèmes. Dekimpe et Déziel (2009), ont proposé un modèle détaillé des différentes interactions observées entre eux. Globalement, le système *las* se retrouve en tête des systèmes régulant ainsi le système *rhl* et le système PQS. Cependant, il a été rapporté que RhlR régule aussi certains gènes sous contrôle de LasR et peut être activé indépendamment de LasR. Il a été évalué que la transcription de 5 à 10% du génome de *P. aeruginosa* est sous le contrôle du QS (Pesci *et al.*, 1997; Schuster et Peter Greenberg, 2006; Dekimpe et Déziel, 2009). La figure 3 résume les principaux facteurs de virulence contrôlés par les trois systèmes de QS chez *P. aeruginosa*.

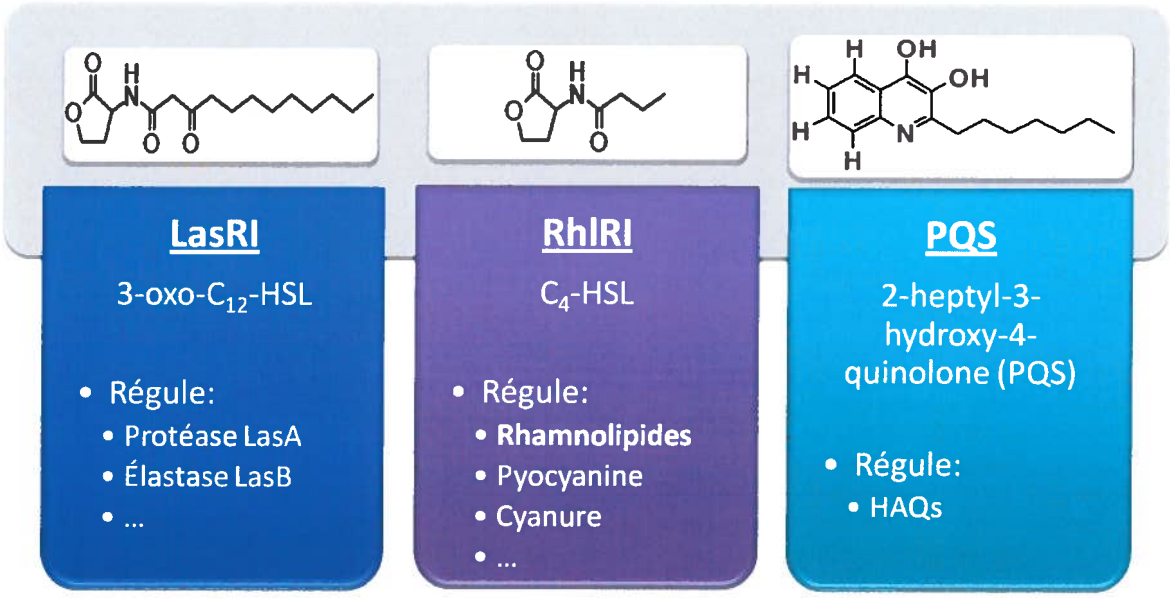


Figure 3. Résumé des trois systèmes de QS retrouvés chez *P. aeruginosa* : structures chimiques des autoinducteurs respectifs à chacun des systèmes et exemples de gènes régulés par ces systèmes.

1.3.3 Biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*

Des glycolipides composés de rhamnose et d'acide β-hydroxydécanoïque ont été initialement trouvés chez *P. aeruginosa* (originalement *P. pyocyanea*) en 1946, sans caractérisation supplémentaire (Bergström *et al.*, 1946). Ce n'est que trois ans plus tard que Jarvis et Johnson décrivent les premières molécules de rhamnolipides chez *P. aeruginosa* et proposent diverses structures possibles pour ces composés (Jarvis et Johnson, 1949). Finalement, en 1965, la structure chimique complète des rhamnolipides est élucidée (Edwards et Hayashi, 1965).

Depuis ces découvertes, les rhamnolipides ont été exhaustivement étudiés sur tous leurs aspects. La voie de biosynthèse de ces molécules a été investiguée *in vivo* à l'aide de différents précurseurs radioactifs comme l'acétate (C^{14}) et le glycérol (C^{14}) (Hauser et Karnovsky, 1957; Hauser et Karnovsky, 1958). Finalement, suite à des essais enzymatiques, la proposition d'un modèle de biosynthèse des rhamnolipides basé sur deux réactions séquentielles de transfert de groupes glycosylés a été élaborée. Cette réaction implique deux rhamnosyltransférases distinctes qui utilisent des molécules de thymidinediphosphorhamnose (TDP-rhamnose) comme donneur du groupement rhamnosyle et soit le β-hydroxydécanoyl-β-hydroxydécanoate ou bien le L-rhamnosyl-β-hydroxydécanoyl-β-hydroxydécanoate comme accepteur (Figure 4) (Burger *et al.*, 1963).

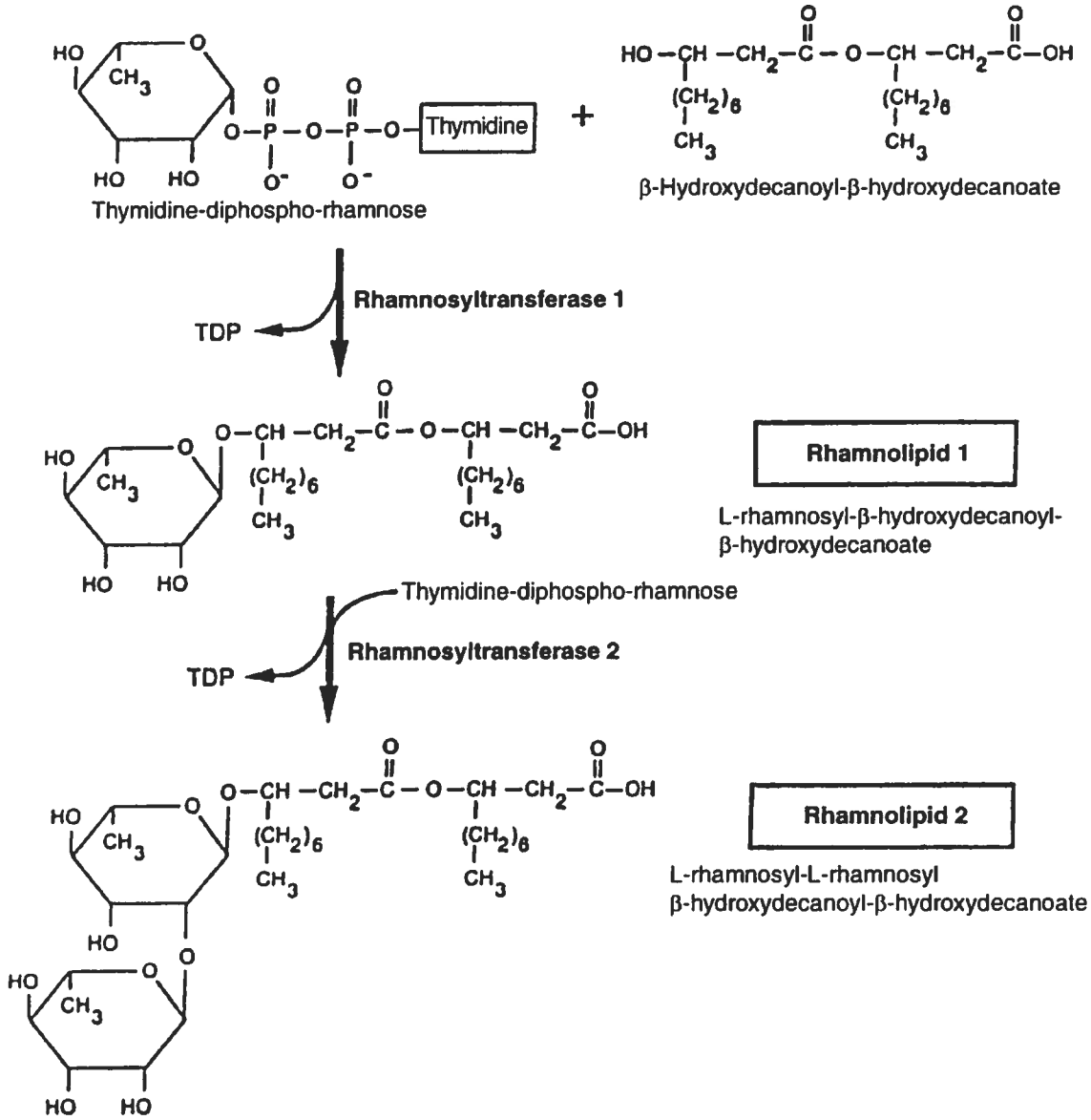


Figure 4. Premier modèle de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. (Burger *et al.*, 1963; Ochsner *et al.*, 1994a)

Ce n'est que plus de 30 ans plus tard que la première rhamnosyltransférase a été découverte avec la mise en évidence des gènes *rhlA* (32.5 kDa) et *rhlB* (47 kDa) et par la démonstration que RhlB est la protéine catalytique de la première rhamnosyltransférase produisant un monorhamnolipide (Ochsner *et al.*, 1994a). Cependant le rôle précis de RhlA

restait mal définit et était associé à la synthèse ou au transport des substrats précurseurs de RhlB ou bien simplement à la stabilisation de RhlB (Ochsner *et al.*, 1994a). La même équipe a aussi déterminé le rôle de *rhlR*, qui code pour une protéine régulatrice de type LuxR et qui est nécessaire pour la biosynthèse des rhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994b). Remarquablement, *rhlR* et *rhlI* se retrouvent directement en *amont* de l'opéron *rhlAB*. La Figure 5 montre l'organisation génétique de gènes *rhlABRI* tel que rapporté pour la première fois par l'équipe (Ochsner et Reiser, 1995).

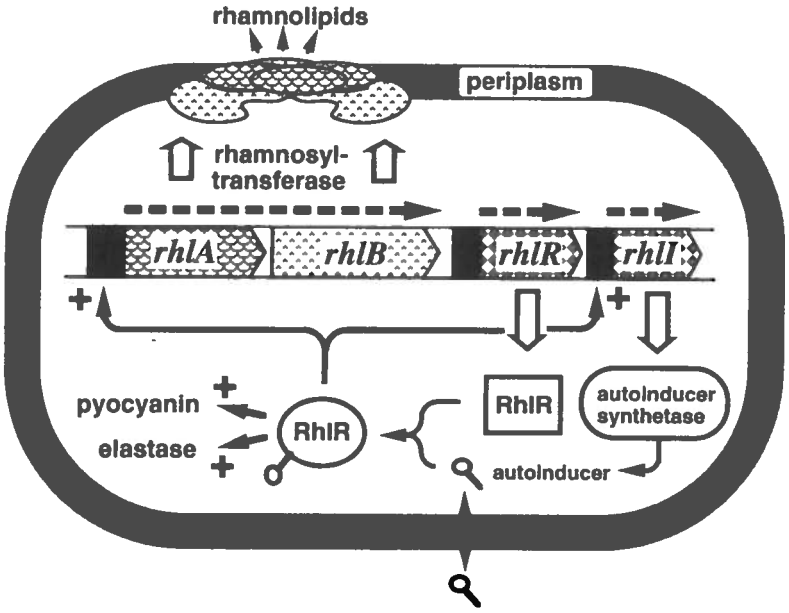


Figure 5. Modèle proposé pour la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* par l'entremise du système QS RhlR/RhlI (Ochsner et Reiser, 1995).

En 2001, la deuxième rhamnosyltransférase permettant le couplage d'une seconde molécule rhamnose au monorhamnolipide a été identifiée. Ce gène, nommé *rhlC*, est retrouvé en opéron avec un gène présent en amont (PA1131) mais dont la fonction reste inconnue encore à ce jour. La protéine RhlC compte 325 acides aminés et a un poids moléculaire de 35.9 kDa. *rhlC* semble être régulé à un même niveau transcriptionnel que l'opéron *rhlAB* (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001).

Suite à la proposition initiale du rôle de RhlA dans la stabilisation membranaire de RhlB, une autre hypothèse a été émise à l'effet que RhlA serait impliquée dans la conversion des 3-hydroxyacyl-ACP en 3-hydroxyacyl-CoA à cause d'une homologie partagée avec la transférase PhaG (Rehm *et al.*, 1998). Ces molécules sont des intermédiaires communs dans la biosynthèse des acides polyhydroxyalcanoïques (PHA). Les véritables précurseurs des rhamnolipides, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques (HAA) ont été découverts chez *P. aeruginosa* en 2002 (Lépine *et al.*, 2002). De plus, cette dernière étude a démontré que pour les différents congénères de HAAs libres retrouvés dans les cultures de *P. aeruginosa*, il y a une préférence pour le résidu 3-hydroxyalcanoyl le plus court à la position hydroxy. Cette observation a aussi été notée chez les rhamnolipides, et ce, dans les mêmes abondances relatives que les HAAs libres (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000; Lépine *et al.*, 2002). Il a été démontré par la suite que RhlA est requise pour la biosynthèse de ces HAAs (Déziel *et al.*, 2003). Finalement, ce n'est que très récemment que la fonction précise de RhlA a été élucidée. Celle-ci a été associée à la conversion de β-hydroxyacyl-ACP provenant du cycle de biosynthèse des acides gras, en β-hydroxydécanoyl-β-hydroxydécanoate, le HAA majoritaire retrouvé chez *P. aeruginosa* (Zhu et Rock, 2008). La figure 6 résume ainsi la voie de biosynthèse de rhamnolipides suite à toutes ces découvertes.

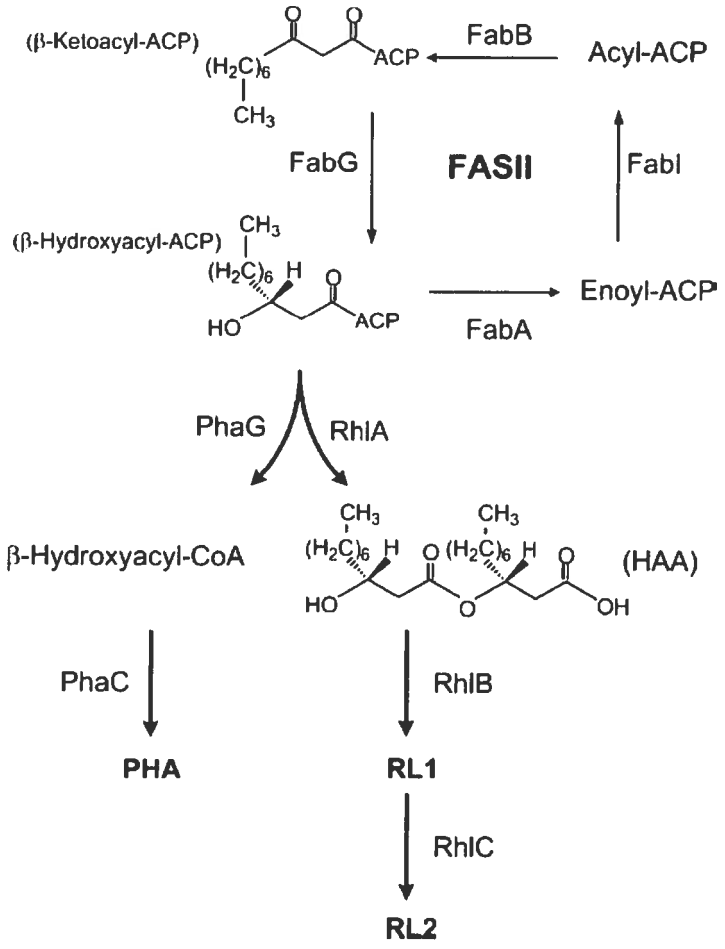


Figure 6. Biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* tel que décrite par Zhu et Rock (2008).

1.3.4 Rôles des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*

1.3.4.1 Biodégradation d'hydrocarbures

Plusieurs études ont été réalisées sur le rôle des rhamnolipides dans la biodégradation des hydrocarbures. Entre autres, une étude a été menée sur la biodégradation d'hexadécane par des espèces de *Rhodococcus* et de *Pseudomonas*. Tel que mentionné précédemment, les *Rhodococcus* produisent des tréhalolipides tandis qu'on retrouve principalement des rhamnolipides chez *Pseudomonas*. L'étude a démontré que ces derniers biosurfactants étaient

requis pour que l'espèce puisse croître sur cette substance hydrophobe. Contrairement aux tréhalolipides qui n'ont permis que l'émulsification du substrat, c'est plutôt la capacité des rhamnolipides à pseudosolubiliser ce même substrat qui a permis sa biodégradation. Cette étude a de plus mis en relief différents modes d'acquisition de substrats hydrophobes possibles lors de la biodégradation (Bouchez-Naïtali *et al.*, 1999; Bouchez-Naïtali et Vandecasteele, 2008).

1.3.4.2 Formation et maintien de biofilms

Bien que les bactéries aient surtout été étudiées dans leur état planctonique, ces dernières occupent plutôt une mode de vie en communauté bactérienne très organisée dans l'environnement. C'est ce qu'on appelle les biofilms. Plusieurs études ont démontré les différents rôles joués par les rhamnolipides au niveau de la formation et du maintien de ces structures complexes. En premier lieu, des tunnels qui permettent un mouvement continu d'éléments nutritifs et d'oxygène à l'intérieur de ces biofilms ont été identifiés grâce à la microscopie confocale. Les rhamnolipides ont été associés au maintien de cette architecture au sein des biofilms (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Deuxièmement, le rôle des rhamnolipides dans la formation des structures de style « champignon » composées de sub-populations cellulaires a aussi été démontré (Lequette et Greenberg, 2005). Néanmoins, les rhamnolipides jouent aussi d'autres rôles chez les biofilms tels la formation de microcolonies dans les phases initiales de développement ainsi que la dissémination du biofilm mature. Ainsi, un mutant *rhlA*- est incapable de produire de telles microcolonies (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). Tout récemment, une équipe de chercheurs a découvert un nouveau système à deux composantes nommé BqsS-BqsR, qui régulerait la dissémination du biofilm mature. En fait, ce système modulerait la biosynthèse des molécules signal des systèmes QS et aussi des rhamnolipides (Dong *et al.*, 2008).

1.3.4.3 Swarming

La motilité bactérienne nommée « swarming » a été découverte chez la bactérie *P. aeruginosa* en l'an 2000 par un groupe de chercheur en Suisse (Köhler *et al.*, 2000). Cette forme

de motilité est permise par une translocation des bactéries sur une surface semi-solide uniquement lorsque la bactérie est en mesure de produire des rhamnolipides, ce qui indique que le swarming est sous le contrôle du QS. Lorsqu'elles effectuent le swarming, les cellules de *P. aeruginosa* deviennent allongées et hyperflagellées. De plus, les pilis de type IV sont aussi nécessaires pour ce déplacement (Köhler *et al.*, 2000; Sharma et Anand, 2002). Les « bras » structurés, appelés dendrites, qui sont observés lors du swarming peuvent varier en terme de forme selon la nature du rhamnolipide présent. Plus précisément, un mutant ne produisant que des monorhamnolipides a un patron swarming différent d'un mutant déficient en ceux-ci (Caiazza *et al.*, 2005).

Une autre étude a démontré l'effet attracteur et répulsif que les différentes structures des biosurfactants produits par *P. aeruginosa* peuvent avoir sur le swarming de cette dernière. Il a été observé que les dirhamnolipides attirent des cellules en swarming tandis que les HAAs les repoussent. De plus, les dirhamnolipides suscitent la formation de dendrites ainsi que la migration tandis que les HAAs inhibent ces dernières. Les monorhamnolipides semblent avoir un effet neutre et agiraient plutôt comme agents mouillants (Tremblay *et al.*, 2007).

1.3.4.4 Facteurs de virulence

Comme mentionné plus haut, *P. aeruginosa* est aussi connue comme une cause majeure d'infections pulmonaires chroniques et de décès chez les personnes atteintes de la fibrose kystique (FK). Cette maladie héréditaire, causée par une mutation autosomale récessive du gène « cystic fibrosis transmembrane conductance regulateur » ou *ctfr*, permet un environnement propice pour le développement d'infections bactériennes chroniques dans les voies respiratoires (Yu *et al.*, 1998; George *et al.*, 2009). Les rhamnolipides excrétés par *P. aeruginosa* sont retrouvés dans le sputum de ces patients (Kownatzki *et al.*, 1987). Il a été démontré que ces biosurfactants permettent un « attachement » de la bactérie sur les cellules épithéliales facilitant ainsi le développement de l'infection (Zulianello *et al.*, 2006). Les rhamnolipides sont connus pour interférer avec le fonctionnement normal des cils de la trachée et, en conséquence, le transport mucociliaire (Read *et al.*, 1992). Des études ont aussi été

menées sur l'activité cytolytique des rhamnolipides sur les macrophages humains (McClure et Schiller, 1992). Finalement, les rhamnolipides sont les hémolysines thermotolérantes identifiées chez *P. aeruginosa* (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980).

Une étude plus récente a été menée sur l'importance de la production de rhamnolipides dans l'établissement et la persistance d'infections de *P. aeruginosa* (Gennip *et al.*, 2009). Cette même équipe avait auparavant démontré que les rhamnolipides causent la nécrose de leucocytes polymorphonucléaires (Jensen *et al.*, 2007). Un mutant *rhlA*, incapable de produire des rhamnolipides, perd sa capacité de se défendre contre ces leucocytes, confirmant le rôle de ces biosurfactants en tant que facteurs de virulence.

Les biofilms que produit *P. aeruginosa* permettent une protection accrue vis-à-vis des défenses de l'hôte lors d'infections. *P. aeruginosa* se retrouve souvent sous forme de biofilms fixés à des cathéters et à des implants. La formation de biofilm fournit également une protection face aux traitements antibiotiques, faisant en sorte que la seule façon d'éradiquer l'infection est souvent l'amputation de la région infectée ou l'enlèvement de la prothèse en question (Brouqui *et al.*, 1995; Gennip *et al.*, 2009).

1.4 *Burkholderia*

1.4.1 Le genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* a été découvert par le pathologiste botanique Américain Walter E. Burkholder, d'où il tire son nom. Ce chercheur a beaucoup étudié les phytopathogènes qui sont les bactéries pathogènes des plantes. La première espèce bactérienne typique du genre avait initialement été nommée *Pseudomonas cepacia*. Cette bactérie avait été identifiée comme l'agent causatif de la maladie de la pourriture des oignions connue sous le nom de « sour skin » (Burkholder, 1948; Burkholder, 1950). La nomenclature de ce phytopathogène s'est maintenue pendant quelques décennies jusqu'à ce que des analyses d'homologies de

l'ARNr de quelques autres espèces, incluant *P. cepacia, P. pseudomallei* et *P. mallei,* amènent à la création du nouveau genre bactérien *Burkholderia*. Plus précisément, ce genre a été créé pour regrouper la plupart des pseudomonades appartenant au groupe II de ces homologues d'ARNr. À ce jour, on compte plus de 45 espèces appartenant à ce genre dont certains pathogènes humains importants (Yabuuchi *et al.*, 1992; LiPuma, 2007; Stoyanova *et al.*, 2007).

Tout comme le genre *Pseudomonas*, les *Burkholderia* sont aussi des bactéries Gram négatives mais elles sont associées plutôt au groupe des β-protéobactéries. Ce genre regroupe les bactéries cliniquement les plus résistantes aux antibiotiques. Les espèces composant ce genre sont dites ubiquitaires puisqu'elles ont été isolées d'endroits très variés tels des sources d'eau, de sols, de plantes, d'insectes ainsi que dans des endroits industrialisés et dans des hôpitaux. On retrouve parmi les nombreuses espèces occupant ces différentes niches écologiques des phytopathogènes comme *B. glumae*, un important ravageur du riz au Japon, et aussi des souches qui vivent en symbiose avec des champignons, tel que *B. fungorum*, ou avec des insectes (Stoyanova *et al.*, 2007). Comme mentionné auparavant, certaines espèces sont d'importants pathogènes humains tels *B. pseudomallei* et *B. mallei*. Cependant, d'autres espèces ont été démontrées comme étant des pathogènes opportunistes chez les personnes souffrant de la fibrose kystique (FK) et aussi chez les personnes immunodéprimées, comme le cas des personnes atteintes de la maladie granulomateuse chronique héréditaire (Stoyanova *et al.*, 2007). C'est le cas de *B. cenocepacia* et *B. multivorans* (George *et al.*, 2009). Chez les plantes, certaines Burkholderiaceae peuvent être soit pathogènes ou symbiotiques (Venturi *et al.*, 2004; Eberl, 2006). Les diverses espèces de *Burkholderia* peuvent donc être utilisées comme agent de biocontrôle, dans les processus de bioremédiation et comme stimulant pour la croissance des plantes (symbiose) (Chiarini *et al.*, 2006).

Des études taxonomiques approfondies de *B. cepacia* ont démontré qu'il existe en fait un complexe d'espèces très similaires, que l'on appelle des génomovars. Ce complexe est nommé « *Burkholderia cepacia* complex », ou BCC, et regroupe à ce jour près d'une quinzaine d'espèces bactériennes dont toutes semblent posséder la capacité d'infecter les humains

(Vandamme *et al.*, 1997; Coenye et Vandamme, 2003; Mahenthiralingam *et al.*, 2005; LiPuma, 2007; Vanlaere *et al.*, 2008). La figure 7 présente un arbre phylogénétique des membres *Burkholderia* et le tableau 2 résume les principales espèces de *Burkholderia* infectant les humains.

Tableau 2. Espèces de *Burkholderia* communément associées aux infections humaines. Tableau adapté de LiPuma, 2007.

Espèces		Caractéristique associée
« *B. cepacia* complex » BCC	Génomovar	Retrouvées principalement chez infections FK
B. cepacia	I	
B. multivorans	II	Génomovars II et III majoritairement retrouvés chez les infections FK (40-45%)
B. cenocepacia	III	
B. stabilis	IV	
B. vietnamiensis	V	
B. dolosa	VI	
B. ambifaria	VII	
B. anthina	VIII	
B. pyrrocinia	IX	
B. ubonensis	X	
...	...	
B. mallei		Agent causatif de la morve
B. pseudomallei		Agent causatif de la mélioïdose
B. thailandensis		Espèce relativement avirulente très similaire génétiquement à *B. pseudomallei*

Figure 7. Arbre phylogénétique de l'ADNr 16s démontrant les ressemblances entre les différentes espèces de *Burkholderia* ainsi qu'avec les genres bactériens reliés. Tiré de Coenye et Vandamme (2003).

1.4.2 Les cas de *B. pseudomallei, B. mallei et B. thailandensis*

B. pseudomallei et *B. mallei* sont d'importants pathogènes. *B. pseudomallei* est l'agent causatif de la mélioïdose, maladie caractérisée communément par une pneumonie aigüe, qui peut se manifester tant chez les humains que chez les animaux. Plus précisément, les manifestations cliniques de cette maladie peuvent être sous la forme d'infection pulmonaire bénigne, de pneumonie chronique ou de septicémie envahissante (Cheng et Currie, 2005). Cette bactérie est le plus souvent retrouvée en régions tropicales comme en Thaïlande, mais elle est aussi retrouvée dans d'autres régions au sud-est de l'Asie et au nord de l'Australie (Leelarasamee et Bovornkitti, 1989; Dance, 2000; Woods, 2002). Récemment, un cas d'infection par ingestion environnemental accidentel par *B. pseudomallei* a été décrit aux États-Unis (Glass *et al.*, 2006). De son côté, *B. mallei*, agent causatif de la morve, est plus apte à infecter les animaux appartenant à la famille des solipèdes, tels les chevaux et les ânes, mais peut aussi causer infection chez les humains (Neubauer *et al.*, 2005; Whitlock *et al.*, 2007). Ce pathogène est hôte-dépendant et ne peut survivre dans la nature à l'extérieur de ce dernier. La maladie de la morve est caractérisée par une infiltration des fosses nasales et des poumons. Elle est décrite comme étant une maladie très douloureuse dont l'administration d'antibiotiques est essentielle pour une guérison complète (Woods, 2002). *B. pseudomallei* ainsi que *B. mallei* sont considérées comme agents de bioterrorisme (Rotz *et al.*, 2002).

B. thailandensis a été découvert lors d'analyses phylogénétiques des régions 16s d'une souche de *B. pseudomallei* et d'une souche relativement semblable à cette dernière. Suite aux analyses structurales et immunologiques de ces deux espèces, les différences au niveau des séquences 16s et des profils biochimiques ont permis la création de l'espèce *B. thailandensis*. La différence la plus remarquable entre ces espèces réside dans l'avirulence de cette dernière (Brett *et al.*, 1998). Le haut niveau de similarité retrouvé dans les séquences génomiques de *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* s'étend même jusqu'à *B. mallei* (Lin *et al.*, 2008). Cette propriété d'extrême ressemblance génétique entre un important pathogène et son jumeau avirulent a permis une multitude d'études effectuées sur un non-pathogène dont les résultats sont applicables au pathogène (Yu *et al.*, 1998). En termes plus simples, *B. thailandensis* peut

servir de modèle alternatif pour l'étude *B. pseudomallei* et *B. mallei*. Il a été stipulé que les différences retrouvées dans la virulence de ces trois espèces peuvent simplement être attribuées à une adaptation de leur génome et aux stratégies utilisées pour survivre à leur niche écologique respective (Kim *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2008).

1.4.3 Les infections par *Burkholderia* et la fibrose kystique

Un des premiers suivis de l'occurrence des infections par des souches de *Burkholderia* chez les patients FK a été effectué en 1984 et a défini le « syndrome cepacia » qui est caractérisé par une pneumonie foudroyante engendrant rapidement le décès du patient (Isles *et al.*, 1984). Depuis ce temps, la co-habitation des nombreuses espèces retrouvées dans ces infections pulmonaires des patients FK, les plus prédominantes étant *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus*, ainsi que les souches de *Burkholderia*, sont le sujet de plusieurs études (Govan et Nelson, 1992; Govan et Deretic, 1996; Coenye *et al.*, 2001). *B. cenocepacia* et *B. multivorans* sont les espèces de *Burkholderia* les plus observées chez les personnes atteintes de la FK (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2002). Ces personnes vont normalement acquérir une infection par les souches BCC seulement vers la fin de la maladie et ce, une fois que l'individu ait été chroniquement colonisé par *P. aeruginosa*. Il a été démontré que l'adhésion de *B. cepacia* (ou *P. cepacia*) aux cellules épithéliales respiratoires est facilitée en présence de *P. aeruginosa*. Il semble que les exoproduits de cette dernière modifie la surface de ces cellules épithéliales respiratoires exposant ainsi des récepteurs qui facilitent l'attachement de *B. cepacia* (Saiman *et al.*, 1990; Eberl, 2006). Des études portant sur les interactions des bactéries appartenant au BCC avec de telles cellules ont aussi été effectuées. Des quelques résultats publiés à ce sujet, il a été démontré que l'ensemble des souches BCC semblent déclencher de façon similaire l'expression de médiateurs immunitaires chez l'hôte tandis que *B. multivorans* semble mieux adhérer aux cellules épithéliales respiratoires. Il a été démontré que les différences majeures au niveau des moyens d'infections du BCC se situent plutôt dans la capacité à adhérer, envahir et causer la mort chez les cellules épithéliales (Moura *et al.*, 2008).

1.4.4 Le QS chez le BCC

Les premières évidences de production de molécules signal d'une souche de BCC ont été constatées à la suite d'une expérience de co-culture de *P. aeruginosa* et de *B. cepacia*. L'addition de surnageant contenant des homosérines lactones (HSL) de *P. aeruginosa* stimulait la production de sidérophores, de protéases et de lipases chez *B. cepacia* (McKenney *et al.*, 1995). C'est à la suite d'une mutagénèse aléatoire par transposon Tn5 que l'identification des homologues de LuxRI a été effectuée chez *B. cepacia*. Une hyperproduction de sidérophores sur milieu solide par un des mutants générés par cette mutagénèse a permis l'identification d'un gène homologue à *luxR* qui a été nommé *cepR*. À près de 700 pb en amont de ce dernier, l'homologue de *luxI* a été identifié et nommé *cepI*. *cepR* et *cepI* sont identiques à 36% et 38% à *rhlR* et *rhlI* de *P. aeruginosa*, respectivement. Il a été démontré que la synthase CepI synthétise du *N*-octanoyl-HSL (C_8-HSL) et du *N*-hexanoyl-HSL (C_6-HSL) (Lewenza *et al.*, 1999). De plus, un système hautement similaire à CepI/CepR a été identifié chez *B. cenocepacia* chez un mutant qui était défectueux dans la formation de biofilm. Cette même étude a démontré que le QS de cette bactérie n'est pas impliqué dans la régulation de l'attachement initial des cellules à une surface, mais plutôt dans le contrôle de la maturation du biofilm. Finalement, on a aussi stipulé la production d'un biosurfactant chez cette espèce et son implication dans le swarming qui semble aussi régulé par QS (Huber *et al.*, 2001).

De nombreuses études subséquentes ont révélé que toutes les souches de BCC possèdent un système CepI/CepR et produisent du C_8- et du C_6-HSL dans un rapport approximatif de 10 :1. Toutefois, la quantité de ces molécules signal peut varier drastiquement entre les espèces (Gotschlich *et al.*, 2001; Lutter *et al.*, 2001). En plus du C_8- et C_6-HSL, quelques souches de *B. vietnamiensis* ont été identifiées pour leur capacité à synthétiser du *N*-décanoyl-HSL (C_{10}-HSL) par l'entremise d'un deuxième système de QS nommé BviI et BviR (Gotschlich *et al.*, 2001; Lutter *et al.*, 2001; Conway et Greenberg, 2002). Tout comme chez *P. aeruginosa*, il a été démontré que le système CepI/CepR régule l'expression de protéases, de chitinases, de sidérophores, d'une polygalacturonase, la motilité swarming et la formation de biofilm chez le BCC (Lewenza *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 2001; Lewenza et Sokol, 2001; Eberl, 2006). De plus,

une caractérisation de ces phénotypes a révélé qu'ils sont régulés par des homosérines lactones chez la majorité des souches BCC (Wopperer *et al.*, 2006). Au moins un autre système de QS a été identifié chez *B. cenocepacia*. Ce système est nommé CciI/CciR et sa synthase CciI semble produire les mêmes HSL que CepI mais dans des rapports de C_6- et C_8-HSL différents. La présence d'une hiérarchie chez ces deux systèmes reste à être complètement élucidée (Malott *et al.*, 2005).

1.4.5 Le QS chez *B. pseudomallei, B. mallei et B. thailandensis*

Les systèmes de QS chez *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis* semblent être plus complexes que ceux retrouvés chez les autres *Burkholderia*. En effet, de multiples orthologues *luxI/luxR* sont retrouvés chez ces espèces qui utilisent plusieurs différentes molécules signal. Ces gènes sont nommés *bps, bpm* ou *pml* chez *B. pseudomallei* (selon l'étude), *bma* chez *B. mallei* et *bta* chez *B. thailandensis* (Ulrich *et al.*, 2004a; Ulrich *et al.*, 2004c; Valade *et al.*, 2004; Eberl, 2006; Duerkop *et al.*, 2009). On retrouve trois homologues *luxI* (*luxI1, luxI2* et *luxI3*) et cinq homologues *luxR* (*luxR1, luxR2, luxR3, luxR4* et *luxR5*). Les gènes *luxI1/luxR1* et *luxI3/luxR3* sont hautement conservés chez ces bactéries ainsi que les deux gènes *luxR4* et *luxR5*, sans qu'on ait cependant retrouvé d'homologues *luxI* à ces deux derniers. Quoique les systèmes de QS soient très conservés entre les trois espèces, le système *luxI2/luxR2* est absent chez *B. mallei*. Il est à noter que ce système ressemble énormément au point de vue génétique au système *bviI/bviR* chez *B. vietnamiensis* (Ulrich *et al.*, 2004b). Une étude détaillée des régions encodant le système *luxI2/luxR2* chez *B. pseudomallei* et *B. mallei* a révélé une possible délétion de cette région précise chez *B. mallei* (Ong *et al.*, 2004).

La molécule signal produite par le système *luxI1/luxR1* chez ces trois espèces est le C_8-HSL (Song *et al.*, 2005; Duerkop *et al.*, 2007; Chandler *et al.*, 2009). Une publication antérieure avait identifié le système PmlI/PmlR chez *B. pseudomallei*, associé maintenant au système *luxI1/luxR1* de cette espèce, et y avait associé la production de C_{10}-HSL (Valade *et al.*, 2004). Toutefois, la présence des multiples systèmes de QS chez cette espèce n'était pas encore élucidée. Pour les systèmes *luxI3/luxR3* de *B. mallei* et *B. thailandensis*, la principale molécule

signal est plutôt du *N*-3-hydroxy-octanoyl-HSL (3OHC$_8$-HSL) (Duerkop *et al.*, 2008; Chandler *et al.*, 2009). Ce n'est que très récemment qu'une étude détaillée a été effectuée sur le système *luxI2/luxR2*. Il a été démontré que les gènes *luxI2/luxR2* de *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* sont conservés dans une région dont l'ensemble des gènes présents semblent impliqués dans la synthèse d'un antibiotique. De plus, cette étude a révélé que chez *B. thailandensis*, BtaI2 produit majoritairement du *N*-3-hydroxy-décanoyl-HSL (3OHC$_{10}$-HSL) ainsi que des quantités minimes de 3OHC$_8$-HSL. Cette recherche a finalement prouvé que *B. thailandensis* synthétise un antibiotique qui est actif contre des bactéries Gram positives et que le système *btaR2/btaI2* est requis pour sa production (Duerkop *et al.*, 2009).

Il est à noter qu'une publication antérieure portant sur le QS de *B. thailandensis* avait indiqué que *btaI1* synthétise du C$_8$-HSL, *btaI2* du C$_{10}$-HSL et *btaI3* du C$_6$-HSL (Ulrich *et al.*, 2004c). Cependant, Duerkop *et al.* (2009) ont rapporté que *B. thailandensis* produit majoritairement du C$_8$-HSL, du 3OHC$_8$-HSL et du 3OHC$_{10}$-HSL et seulement des quantités très minimes des autres HSL. De plus, cette équipe a démontré que *btaI2* n'est pas une synthase de C$_{10}$-HSL mais plutôt une synthase de 3OHC$_{10}$-HSL ainsi que de petites quantités de 3OHC$_8$-HSL.

Tableau 3. Résumé des principales molécules signal produites par les trois synthases *luxI* retrouvés chez *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis*.

	Systèmes QS			Autres molécules signal détectées
	luxI1/luxR1	***luxI2/luxR2***	***luxI3/luxR3***	
B. pseudomallei[1]	C_8-HSL	N/D	N/D	C_{10}-HSL 3OHC_8-HSL 3OHC_{10}-HSL 3OC_{14}-HSL[2]
B. mallei	C_8-HSL	Système absent	3OHC_8-HSL	
B. thailandensis[3]	C_8-HSL	3OHC_{10}-HSL 3OHC_8-HSL	3OHC_8-HSL	3OHC_4-HSL[4] 3OHC_9-HSL[5] 3OHC_{12}-HSL[6] ...

[1]L'équipe de Ulrich *et al.* (2004a) a détecté plusieurs HSL dans les surnageants de *B. pseudomallei* sans pourvoir associer ces molécules signal à leurs synthases respectives.

[2]*N*-3-oxo-tétradécanoyl-HSL

[3]Il est à noter que *B. thailandensis* produit aussi des quantités très minimes d'autres molécules signal dont les synthases responsables de leur production n'ont pas encore été élucidées (Chandler *et al.*, 2009; Duerkop *et al.*, 2009).

[4]*N*-3-hydroxy-butyroyl-HSL

[5]*N*-3-hydroxy-nonanoyl-HSL

[6]*N*-3-hydroxy-dodécanoyl-HSL

N/D : Non déterminé à ce jour.

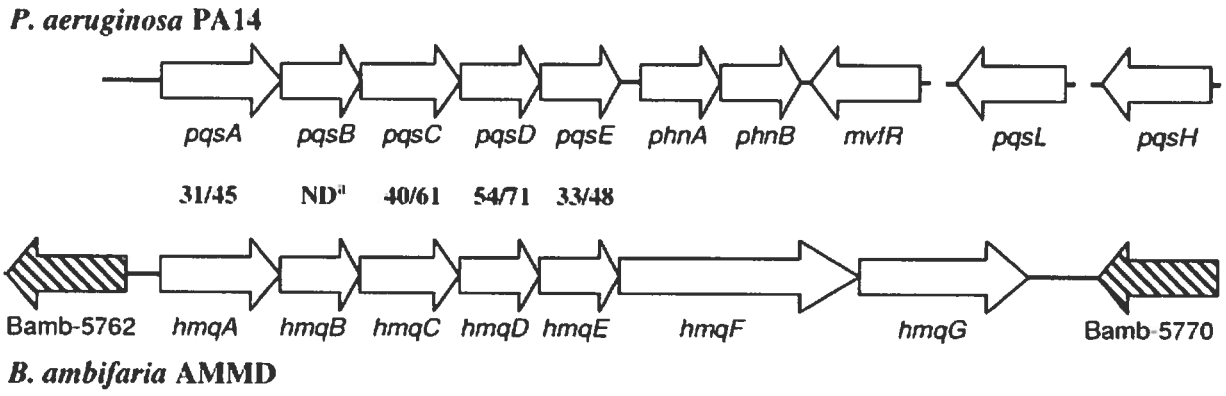


Figure 8. Comparaison de l'opéron *pqsABCDE* chez *P. aeruginosa* PA14 et de l'opéron *hmqABCDEFG* chez *B. ambifaria* AMMD. Les valeurs représentent les identités/similarités entre les protéines de chacun. Figure tirée de Vial *et al*, 2008.

1.4.6 Les biosurfactants chez les *Burkholderia*

Il n'y a pas beaucoup d'études publiées sur la production de biosurfactants par les membres *Burkholderia*. La première a observé la production d'un rhamnolipide, le 2-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxytétradécanoyl-β-hydroxytétradécanoate (Rha-Rha-C_{14}-C_{14}), lors d'études liées à une activité cytotoxique et hémolytique retrouvée chez *B. pseudomallei* (Häußler *et al.*, 1998). Des analyses par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire ont permis d'attribuer une masse moléculaire de 762 Da à cette molécule. Sans pousser la caractérisation et la recherche des conditions de production de ce rhamnolipide, cette recherche s'est concentrée sur sa cytotoxicité par rapport à diverses lignées cellulaires (Häußler *et al.*, 1998; Häußler *et al.*, 2003). Basé sur cette découverte, l'identification d'un même rhamnolipide, le Rha-Rha-C_{14}-C_{14}, a été possible chez *B. plantarii* (Andrä *et al.*, 2006). Tout comme l'équipe de Häußler, les propriétés toxiques de la molécule ont été étudiées, cette fois sur des cellules mononucléaires humaines. Cependant, encore une fois, les conditions de production et la nature de l'ensemble des rhamnolipides n'ont pas été décrites dans l'étude.

Une autre étude, portant sur l'implication du système *cep* sur la formation de biofilm chez une souche *B. cepacia*, a démontré que le swarming de ce dernier est sous le contrôle de QS. On a émis l'hypothèse que cette motilité bactérienne est permise grâce à la production d'un biosurfactant qui serait à son tour contrôlée par QS. Cependant ce biosurfactant n'a pas été caractérisé (Huber *et al.*, 2001). En 2008, un glycolipide a été identifié chez une souche de *B. cenocepacia*. Ce dernier possède une masse moléculaire de 550.4 g/mol mais n'a été que partiellement purifié. Ce biosurfactant permet d'améliorer de la solubilisation de pesticides mais sa caractérisation structurelle n'a pas encore été effectuée (Wattanaphon *et al.*, 2008). En résumé, il y a eu très peu de publications qui portent sur l'identification et la caractérisation de biosurfactants produits par des espèces appartenant au genre *Burkholderia*.

1.5 *Galleria mellonella* comme hôte alternatif pour l'étude de virulence

1.5.1 Modèles d'infections couramment utilisées pour l'étude de la virulence chez *Burkholderia*

Il existe divers modèles pour l'étude de la virulence des souches appartenant à la famille *Burkholderia*. Entre autres, on retrouve la luzerne, le rat et la souris ainsi que les nématodes *Caenorhabditis elegans* et *Panagrellus redivivus* (Chiarini *et al.*, 2006). Considérent les niches écologiques très variées de ces différentes hôtes, les résultats obtenus quand à la pathogénécité de souches de *Burkholderia* envers eux peuvent aussi être très variables. Plus récemment, la variation de phase de *B. ambifaria* a été étudiée à l'aide de la mouche *Drosophila melanogaster*, de macrophages humains, de l'amide *Dictyostelium discoideum* ainsi qu'avec l'insecte *Galleria mellonella* (Vial *et al.*, 2009). Finalement, puisque certaines espèces de *Burkholderia* sont des phytopathogènes, l'emploi de l'oignon comme modèle d'infection est aussi très répandu (Jacobs *et al.*, 2008; Springman *et al.*, 2009).

1.5.2 Utilisation de *G. mellonella* comme hôte alternatif

G. mellonella, communément appelé « greater wax moth » en anglais, est un insecte fort intéressant pour des études nécessitant des hôtes alternatifs d'infection. En effet, les insectes possèdent des systèmes de défense antibactériens assez avancés et tout comme les mammifères, ils ont un système circulatoire et une réponse immunitaire innée complexe. L'idée d'utiliser des insectes pour de telles études remonte aux années 1960 (Chadwick, 1967). Une étude a bien démontré une corrélation dans la virulence de mutants de *P. aeruginosa* chez la souris en comparaison avec *G. mellonella*. Les résultats obtenus ont indiqué que l'utilisation de cet insecte est un outil puissant pour l'identification et la caractérisation de facteurs de virulence microbiens impliqués dans le développement de maladies chez les mammifères (Jander *et al.*, 2000). Plusieurs autres études portant sur la virulence de cette bactérie ont aussi été effectuées avec la larve de cet insecte (Lysenko, 1963; Jarrell et Kropinski, 1982; Jarosz, 1995). Notamment, une étude a été menée à l'aide de ce modèle d'infection alternatif pour étudier le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* dont les résultats ont aussi été corrélés avec ceux obtenus à la suite d'essais cytopathologiques utilisant un système de culture de tissus de mammifère (Miyata *et al.*, 2003). *G. mellonella* a d'ailleurs aussi été utilisé comme hôte alternatif d'infection avec d'autres microorganismes tels *Yersinia pseudotuberculosis*, *Acinetobacter baumannii* et *Francisella tularensis* (Aperis *et al.*, 2007; Champion *et al.*, 2009; Peleg *et al.*, 2009).

1.5.3 Étude de *Burkholderia* à l'aide de G. *mellonella*

L'utilisation de *G. mellonella* comme hôte alternatif d'infection avec les bactéries appartenant au genre *Burkholderia* est très récente. On retrouve dans la littérature une étude publiée en 2008 portant sur la virulence de pathogènes importants comme *B. pseudomallei* et *B. mallei* (Schell *et al.*, 2008). Cette étude a bien démontré l'utilité de *G. mellonella* pour l'identification de nouveaux gènes de virulence chez *B. mallei* dans une approche de comparaison génétique de cette dernière avec *B. pseudomallei*. Cette même année, une autre équipe a adapté et développé l'utilisation de *G. mellonella* comme hôte pour étudier les infections avec les membres du complexe cepacia appartenant aux *Burkholderia* (Seed et

Dennis, 2008). Cette étude a permis d'examiner la pathogénécité des membres BCC ainsi que diverses souches de ces espèces. Par la suite, l'identification de facteurs de virulence spécifiques et universels a été effectuée chez plusieurs souches de *B. cenocepacia* à l'aide de multiples hôtes d'infections. Les résultats ont démontré que le QS régulé par des HSL joue un rôle central dans le contrôle de traits pathogéniques chez ces souches de *B. cenocepacia*. De plus, l'étude appuie le modèle que le QS régule l'expression de plusieurs facteurs de virulence dont l'importance varie selon l'infection dans différents organismes hôtes (Uehlinger *et al.*, 2009).

Chapitre II - Article scientifique

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Danielle Dubeau sous la supervision de François Lépine, Ph.D. et Eric Déziel, Ph.D. François Lépine a contribué plus particulièrement en ce qui concerne les volets de chimie et de spectrométrie de masse tandis qu'Eric Déziel a offert une expertise plus adaptée en biologie moléculaire. Donald E. Woods, Ph. D., a préparé l'échantillonnage de *Burkholderia pseudomallei* pour les analyses en spectrométrie de masse. L'article a été rédigé par Danielle Dubeau et révisé par François Lépine, Éric Déziel ainsi que Donald E. Woods.

« *The majority of the experiments carried out in this manuscript were done by Danielle Dubeau under the supervision of François Lépine, Ph.D. and Eric Déziel, Ph.D. François Lépine contributed in great part to the chemistry and mass spectrometry aspects of the project. Eric Déziel offered outstanding expertise in molecular biology and experimental design. Donald E. Woods, Ph.D., prepared samples of Burkholderia pseudomallei for mass spectrometry analysis. The manuscript was drafted by Danielle Dubeau and revised by François Lépine, Eric Déziel and Donald E. Woods.* »

2.1.1 Attestation des co-auteurs

----Original Message-----
From: Lepine, Francois
Sent: Thu 25/06/2009 2:09 PM
To: Dubeau, Danielle
Subject: RE: Attestation des co-auteurs

J'atteste l'exactitude de ce message de madame Danielle Dubeau

François Lépine
Professeur

-----Message d'origine-----
De : Dubeau, Danielle
Envoyé : 25 juin 2009 14:03

À : Lepine, Francois
Objet : Attestation des co-auteurs

Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Danielle Dubeau sous la supervision de François Lépine, Ph.D. et Eric Déziel, Ph.D. François Lépine a contribué plus particulièrement en ce qui concerne les volets de chimie et de spectrométrie de masse tandis qu'Eric Déziel a offert une expertise plus adaptée en biologie moléculaire. Donald E. Woods, Ph. D., a préparé l'échantillonnage de Burkholderia pseudomallei pour les analyses en spectrométrie de masse. L'article a été rédigé par Danielle Dubeau et révisé par François Lépine, Éric Déziel ainsi que Donald E. Woods.

Merci,
Danielle Dubeau

Author's contribution

The majority of the experiments carried out in this manuscript were done by Danielle Dubeau under the supervision of François Lépine, Ph.D. and Eric Déziel, Ph.D. François Lépine contributed in great part to the chemistry and mass spectrometry aspects of the project. Eric Déziel offered outstanding expertise in molecular biology and experimental design. Donald E. Woods, Ph.D., prepared samples of Burkholderia pseudomallei for mass spectrometry analysis. The manuscript was drafted by Danielle Dubeau and revised by François Lépine, Eric Déziel and Donald E. Woods.

Thank you,
Danielle Dubeau

-----Original Message-----
From: Deziel, Eric
Sent: Fri 03/07/2009 11:13 AM
To: Dubeau, Danielle
Subject: RE : Attestation des co-auteurs

J'atteste que la description de ma contribution à l'article, telle décrite ci-dessous, est conforme à la réalité.

Eric Déziel, Ph.D.
Professeur-chercheur/ Assistant professor-investigator
INRS-Institut Armand-Frappier
531, Boul. des Prairies
Laval, Québec
H7V 1B7 Canada

Tél. / Phone : 450-687-5010 ext./poste 4220 (Lab 4288)
Télécop. / Fax : 450-686-5501
Courriel / email : eric.deziel@iaf.inrs.ca
Web : http://www.microbio-environnement.org/

-------- Message d'origine--------
De: Dubeau, Danielle
Date: mar. 2009-06-30 14:13
À: Deziel, Eric
Objet : TR : Attestation des co-auteurs

Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Danielle Dubeau sous la supervision de François Lépine, Ph.D. et Eric Déziel, Ph.D. François Lépine a contribué plus particulièrement en ce qui concerne les volets de chimie et de spectrométrie de masse tandis qu'Eric Déziel a offert une expertise plus adaptée en biologie moléculaire. Donald E. Woods, Ph. D., a préparé l'échantillonnage de Burkholderia pseudomallei pour les analyses en spectrométrie de masse. L'article a été rédigé par Danielle Dubeau et révisé par François Lépine, Éric Déziel ainsi que Donald E. Woods.

Merci,
Danielle Dubeau

Author's contribution

The majority of the experiments carried out in this manuscript were done by Danielle Dubeau under the supervision of François Lépine, Ph.D. and Eric Déziel, Ph.D. François Lépine contributed in great part to the chemistry and mass spectrometry aspects of the project. Eric Déziel offered outstanding expertise in molecular biology and experimental design. Donald E. Woods, Ph.D., prepared samples of Burkholderia pseudomallei for mass spectrometry analysis. The manuscript was drafted by Danielle Dubeau and revised by François Lépine, Eric Déziel and Donald E. Woods.

Thank you,
Danielle Dubeau

-----Original Message-----
From: Donald E. Woods, Ph.D. [mailto:woods@ucalgary.ca]
Sent: Thu 25/06/2009 3:28 PM
To: Dubeau, Danielle
Subject: Re: Author's Attestation

Danielle:

Following is my attestation in regards to my contributions to the submitted manuscript:

My laboratory prepared samples of Burkholderia pseudomallei for mass spectrometry analysis. I participated in the revision of the manuscript.

Best wishes.

Donald E. Woods, Ph.D.
Professor, Microbiology and Infectious Diseases
Canada Research Chair in Microbiology
Fellow, Canadian Academy of Health Sciences

Address:
Department of Microbiology & Infectious Diseases
University of Calgary Health Sciences Centre
3330 Hospital Drive, NW
Calgary, Alberta CANADA
T2N 4N1

Phone: (403) 220-2564
FAX: (403) 210-8504
email: woods@ucalgary.ca

-----Message d'origine-----
De : Dubeau, Danielle
Envoyé : 25 juin 2009 14:27
À : woods@ucalgary.ca
Objet : Attestation des co-auteurs

Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Danielle Dubeau sous la supervision de François Lépine, Ph.D. et Eric Déziel, Ph.D. François Lépine a contribué plus particulièrement en ce qui concerne les volets de chimie et de spectrométrie de masse tandis qu'Eric Déziel a offert une expertise plus adaptée en biologie moléculaire. Donald E. Woods, Ph. D., a préparé l'échantillonnage de Burkholderia pseudomallei pour les analyses en spectrométrie de masse. L'article a été rédigé par Danielle Dubeau et révisé par François Lépine, Éric Déziel ainsi que Donald E. Woods.

Merci,
Danielle Dubeau

Author's contribution
The majority of the experiments carried out in this manuscript were done by Danielle Dubeau under the

supervision of François Lépine, Ph.D. and Eric Déziel, Ph.D. François Lépine contributed in great part to the chemistry and mass spectrometry aspects of the project. Eric Déziel offered outstanding expertise in molecular biology and experimental design. Donald E. Woods, Ph.D., prepared samples of Burkholderia pseudomallei for mass spectrometry analysis. The manuscript was drafted by Danielle Dubeau and revised by François Lépine, Eric Déziel and Donald E. Woods.

Thank you,
Danielle Dubeau

2.2 Accusé de réception

-----Original Message-----
From: BioMed Central Editorial [mailto: editorial@biomedcentral.com]
Sent: Thu 25/06/2009 11:59 AM
To: Dr Eric Déziel
Cc: Dr Eric Déziel; Danielle Dubeau; Eric Déziel; Donald E. Woods; François Lépine

Subject: 9493300662854940 Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids

Article title: Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids
MS ID : 9493300662854940
Authors : Danielle Dubeau, Eric Déziel, Donald E. Woods and François Lépine
Journal : BMC Microbiology

Dear Dr Déziel

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/9493300662854940_article.pdf (2907K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1805532101286114_comment.pdf
If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click

"Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript shortly. The submitting author can check on the status of your manuscript in peer review at any time by logging into 'My BioMed Central' (http://www.biomedcentral.com/my).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

You will be able to change details or submit revised versions of your manuscript by going to:

http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=9493300662854940

Regards

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: http://www.biomedcentral.com/

2.3 Précisions sur la présentation de l'article

Ce chapitre présente le manuscrit original soumis au journal *BMC Microbiology* le 25 juin 2009. Afin de conserver l'uniformité de la dissertation, le style des citations et des références a été modifié par rapport à celui exigé par les éditeurs du journal afin de respecter celui utilisé dans le présent mémoire. Pour alléger le tout, la liste des références a aussi été incorporée à celle du document. Finalement, les différentes sections de l'article ont été numérotées afin de les enchaîner inclusivement dans le mémoire.

2.4 *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids

Danielle Dubeau[1], Eric Déziel[1*], Donald E. Woods[2] and François Lépine[1*]

[1]INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

[2]Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Calgary Health Sciences Centre, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N1

*Corresponding authors

Email addresses:

DD: danielle.dubeau@iaf.inrs.ca

ED: eric.deziel@iaf.inrs.ca

DEW: woods@ucalgary.ca

FL: francois.lepine@iaf.inrs.ca

2.4.1 Abstract

Background

Rhamnolipids are surface active molecules composed of rhamnose and β-hydroxydecanoic acid. These biosurfactants are produced mainly by *Pseudomonas aeruginosa* and have been thoroughly investigated since their early discovery. Recently, they have attracted renewed attention because of their involvement in various multicellular behaviors. Despite this high interest, only very few studies have focused on the production of rhamnolipids by *Burkholderia* species.

Results

Orthologs of *rhlA*, *rhlB* and *rhlC*, which are responsible for the biosynthesis of rhamnolipids in *P. aeruginosa,* have been found in the non-infectious *B. thailandensis,* as well as in the genetically similar important pathogen *B. pseudomallei*. In contrast to *P. aeruginosa*, both *Burkholderia* species contain these three genes necessary for rhamnolipid production within a single gene cluster. Furthermore, two identical, paralogous copies of this gene cluster are found on the second chromosome of these bacteria. Both *Burkholderia* spp. produce rhamnolipids containing 3-hydroxy fatty acid moieties with longer side chains than those described for *P. aeruginosa*. Additionally, the rhamnolipids produced by *B. thailandensis* contain a much larger proportion of dirhamnolipids versus monorhamnolipids when compared to *P. aeruginosa*. The rhamnolipids produced by *B. thailandensis* reduce the surface tension of water to 42 mN/m while displaying a critical micelle concentration value of 225 mg/L. Separate mutations in both *rhlA* alleles, which are responsible for the synthesis of the rhamnolipid precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid, prove that both copies of the *rhl* gene cluster are functional, but one contributes more to the total production than the other. Finally, a double *rhlA* mutant that is completely devoid of rhamnolipid production is incapable of swarming motility, showing that both gene clusters contribute to this phenotype.

Conclusions

Collectively, these results add another *Burkholderia* species to the list of bacteria able to produce rhamnolipids and this, by the means of two identical functional gene clusters. Our results also demonstrate the very impressive tensio-active properties these long-chain rhamnolipids possess in comparison to the well-studied short-chain ones from *P. aeruginosa*.

2.4.2 Background

Rhamnolipids are surface-active compounds that have been extensively studied since their early identification in *Pseudomonas aeruginosa* cultures in the late 1940s (Jarvis et Johnson, 1949). However, it was only in the mid 1960s that the structure of a rhamnolipid molecule was first reported (Edwards et Hayashi, 1965). Due to their excellent tensioactive properties, low toxicity and high biodegradability, these biosurfactants are promising candidates for a variety of industrial applications as well as bioremediation processes (Kitamoto *et al.*, 2002; Rahman et Gakpe, 2008). Furthermore, rhamnolipids have recently received renewed attention because of their involvement in *P. aeruginosa* multicellular behavior, such as biofilm development and swarming motility (Davey *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Rhamnolipids are also considered virulence factors as they interfere with the normal functioning of the tracheal ciliary system and are found in sputa of cystic fibrosis (CF) patients infected by *P. aeruginosa* (Kownatzki *et al.*, 1987; Read *et al.*, 1992; Zulianello *et al.*, 2006). Moreover, rhamnolipids inhibit the phagocytic response of macrophages and are known as the heat-stable extracellular hemolysin produced by *P. aeruginosa* (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980; McClure et Schiller, 1992).

These amphiphilic molecules are usually produced by *P. aeruginosa* as a complex mixture of congeners composed of one or two molecules of L-rhamnose coupled to a 3-hydroxyalkanoic acid dimer, the most abundant being L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (Rha-C_{10}-C_{10}) and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (Rha-Rha-C_{10}-C_{10}) (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000; Soberon-Chavez *et*

al., 2005). The biosynthetic pathway of rhamnolipids has been the subject of many studies that have demonstrated the implication of three crucially important genes, *rhlA, rhlB* and *rhlC*. The first enzyme, RhlA, is responsible for the interception of two molecules of β-hydroxydecanoyl-ACP, an intermediate in the *de novo* fatty acid biosynthesis cycle, to produce 3-hydroxyalkanoic acid dimers, known as 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) (Déziel *et al.*, 2003; Zhu et Rock, 2008). The next reaction, implicating the membrane-bound RhlB rhamnosyltransferase, uses dTDP-L-rhamnose to add the first rhamnose moiety to an HAA molecule, thus forming a monorhamnolipid (L-rhamnosyl-3-hydroxyalkanoyl-3-hydroxyalkanoate). Finally, an additional rhamnosyltransferase, RhlC, couples a second rhamnose molecule to a monorhamnolipid by the means of another dTDP-L-rhamnose, producing the final dirhamnolipid (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxyalkanoyl-3-hydroxyalkanoate) (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001).

Previously belonging to the *Pseudomonas* genus, *Burkholderia* spp. are attracting increasing interest because of their involvement in human infections. *Burkholderia* is best known for its pathogenic members like *B. pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, as well as the opportunistic pathogens belonging to the *B. cepacia* complex (Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2008). Two studies have reported evidence of the production of a single dirhamnolipid by *B. pseudomallei* as well as by another member of the same genus, *B. plantarii* (Häußler *et al.*, 1998; Andrä *et al.*, 2006). Here, we investigate the production of rhamnolipids by *B. thailandensis*, a non-infectious *Burkholderia* species closely related to *B. pseudomallei* (Brett *et al.*, 1998), and by *B. pseudomallei* itself. In contrast to the mandated *B. pseudomallei* guidelines, an advantage to studying *B. thailandensis* is that it does not require biosafety level 3 conditions, and there is no restriction on the use of antibiotic-resistance markers for its genetic manipulation. In addition, numerous studies have shown to what extreme level these two *Burkholderia* species are closely related at a genetic point of view and that *B. thailandensis* can serve as a surrogate for studying many different traits, including physiological characteristics as well as pathogenic factors in regards to *B. pseudomallei* (Kim *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006).

2.4.3 Results

Presence of *rhlABC* homologs in *B. thailandensis* and *B. pseudomallei*

Following a search in sequenced *B. thailandensis* and *B. pseudomallei* genomes, orthologs of the *P. aeruginosa* rhamnolipid-biosynthesis genes *rhlA, rhlB* and *rhlC* were found in all associated strains. Interestingly, both species possess two 100% identical *rhl* gene clusters on their second chromosome (Fig. 9). A search in the partially sequenced genome of *B. pseudomallei* 1026b (Genomes OnLine Database; http://www.genomesonline.org), the strain used in this study, indicated the same arrangement as in strain 1710b. The *rhlA/rhlB/rhlC* orthologs of these two *Burkholderia* species are highly similar to one another with an identity ranging from 89% to 96%. Furthermore, the protein sequences of these genes share almost 50% identity with those of *P. aeruginosa* PA01, which possesses a single copy of these genes on its genome. Another interesting observation is that for *P. aeruginosa*, *rhlA* and *rhlB* are found in one operon whereas *rhlC* is found in a different bicistronic operon (Fig. 9). Finally, Table 5 shows that the remaining ORFs present in the *rhl* gene clusters, including the one adjacent to *rhlC* in *P. aeruginosa*, all seem to have functions related to transport or efflux.

Rhamnolipid production by *B. thailandensis* and *B. pseudomallei*

Due to the high similarity between the *rhlA/rhlB/rhlC* genes found in *P. aeruginosa* and their homologs in *B. thailandensis*, the latter was tested for the production of rhamnolipids. Using *B. thailandensis* in various rhamnolipid production growth conditions, the initial results from LC/MS analysis revealed a dominant peak in the total-ion chromatograph (TIC). This peak presented a pseudomolecular ion of *m/z* 761 in negative-ion mode, a value that is compatible with a compound consisting of two L-rhamnose molecules as well as two β-hydroxytetradecanoic acids. A corresponding rhamnolipid, 2-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxytetradecanoyl-β-hydroxytetradecanoate (Rha-Rha-C_{14}-C_{14}), with a molecular weight of 762 Da, has been previously reported from *B. pseudomallei* and *B. plantarii* cultures (Häußler *et al.*, 1998; Häußler *et al.*, 2003; Andrä *et al.*, 2006). Further experimentation was done to investigate the effects of various growth media and carbon sources on the production of rhamnolipids by *B. thailandensis*. Mineral and rich culture media were assayed:

tested substrates included carbohydrates such as mannitol, dextrose, sucrose, glycerol and fructose along with various vegetable oils such as canola oil, olive oil, palm oil and sunflower oil, all at a final concentration of 4%. Several studies using plant-derived oils have demonstrated that these inexpensive hydrophobic materials are excellent carbon substrates for biosurfactant production (Robert *et al.*, 1989; Rahman *et al.*, 2002). Under our experimental conditions, glycerol and canola oil were the best carbohydrate and vegetable oil for rhamnolipid production, achieving concentrations of 419.10 mg/L and 1473.72 mg/L, respectively, after 13 days of culture (Table 6). In both cases, the dirhamnolipid Rha-Rha-C_{14}-C_{14} was the most abundant with values ranging from 70% to 77% relative to total rhamnolipids, while its precursor Rha-C_{14}-C_{14} dominates the monorhamnolipid category with 5.8 and 6.5 % of total rhamnolipids. Detailed analysis of *B. thailandensis* cultures revealed a series of long chain rhamnolipids, as shown in Table 6. These rhamnolipids are predominately composed of a C_{14}-C_{14} chain length fatty acid moiety as well as others comprised of chains ranging from C_{10}-C_{12} to C_{16}-C_{16} chain length.

To confirm that the ions identified by LC/MS are indeed rhamnolipids, they were fragmented and analyzed by LC/MS/MS. To allow for comparison with *P. aeruginosa* rhamnolipids, monorhamnolipids obtained from *B. thailandensis* were fragmented and the observed fragmentation pattern was similar to the one we observed for *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 1999). For an isomeric pair of rhamnolipid congeners bearing two 3-hydroxy fatty acids of different chain lengths (for example Rha-C_{12}-C_{14} and Rha-C_{14}-C_{12}), the relative abundance of the various congeners was studied. Because such isomers cannot be resolved chromatographically, the MS/MS spectrum of their common pseudomolecular ions show fragment ions characteristic of both compounds, as seen in Figure 10. As we have previously reported for *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2000), within each isomeric pair, the rhamnolipid congener with the shortest chain adjacent to the sugar moiety is more abundant. The rhamnolipids produced by *B. thailandensis* were then subjected to an enzymatic hydrolysis of the rhamnose groups with naringinase (Trummler *et al.*, 2003) to produce the corresponding HAAs, as observed with *P. aeruginosa*.

With these results in hand, we investigated the potential of the highly genetically related species *B. pseudomallei* to produce a range of rhamnolipids other than the previously described Rha-Rha-C_{14}-C_{14}. Figure 11 shows the production of the most abundant rhamnolipids by this pathogen. The same long-chain bearing congeners than in *B. thailandensis* were discovered, including the dominant Rha-Rha-C_{14}-C_{14}.

Critical Micelle Concentration (CMC) and surface tension assays

To investigate the potential of the long-chain rhamnolipids produced by *Burkholderia* species for lowering surface tension, the critical micelle concentration of this mixture of rhamnolipid congeners was established (Fig. 12). At the CMC of about 250 mg/L, the surface tension is lowered to 43 mN/m.

Both *rhlA* alleles are functional and necessary for maximal rhamnolipid production

The contribution to rhamnolipid production of the two identical *rhl* gene clusters found on the *B. thailandensis* genome was tested by creating single *rhlA* mutants for each allele, as well as a double *rhlA* mutant. These three mutants were then investigated for their ability to produce rhamnolipids (Fig. 13). Several replicates confirmed that the *B. thailandensis rhlA1* mutant produces more rhamnolipids than the *rhlA2* mutant. The rhamnolipids produced by each of these mutants are composed of the same congeners in the same proportions as the wild type strain and only a quantitative difference is observed. Intriguingly, total production of both single mutants do not equal to the production of the wild type strain. Finally, the double *rhlA* mutant does not produce any detectable rhamnolipids.

Swarming motility requires both *rhlA* alleles

In *P. aeruginosa*, production of rhamnolipids is essential for expression of the multicellular behaviour called swarming motility (Henrichsen, 1972). It was therefore of interest to assess whether rhamnolipids are also important for this type of motility in *B. thailandensis*. Furthermore, since both *rhlA* alleles are functional and contributing to the production of rhamnolipids in this species, we wondered if the amount of biosurfactants

produced by the single mutants would be sufficient to permit the swarming phenotype. *rhlA1* and *rhlA2* mutants of *B. thailandensis* were thus tested for their ability to swarm. Figure 14A (Control column) shows the swarming phenotype of the wild type strain as well as the single *rhlA* mutants and the double *rhlA* mutant. We observe that the single mutants have hindered swarming motility whereas the double mutant is incapable of such motility. Thus, one functional copy of *rhlA* does not provide enough rhamnolipid production to allow normal surface translocation on a semi-solid surface. Interestingly, the *rhlA1* mutant is capable of moving to a greater distance than the *rhlA2* mutant (Fig. 14A). This observation concurs with the above results showing the superior rhamnolipid production by the *rhlA1* mutant compared to the *rhlA2* mutant (Fig. 13). Finally, as expected, the double *rhlA* mutant is incapable of any swarming.

To test whether swarming phenotype restoration is possible with our *rhlA* mutants, swarm assays were performed with the addition of increasing concentrations of exogenous rhamnolipids. We observed that the *rhlA1* mutant requires less exogenous rhamnolipids to regain complete swarming motility compared to the *rhlA2* mutant, consistent with the finding that this latter mutant produces less rhamnolipids. These results indicate that a critical concentration of biosurfactant is necessary to enable bacteria to swarm. Accordingly, the double mutant requires much more exogenous rhamnolipids to restore this phenotype. Cross-feeding experiments with both *rhlA* mutants were also performed to verify whether swarming phenotype could be regained. Interestingly, when the two mutants are mixed before plating, swarming is restored (Fig. 14B, right), contrary to when mutants are simply spotted side-by-side (Fig. 14B, left).

2.4.4 Discussion

***B. thailandensis* and *B. pseudomallei* harbor *rhlA/rhlB/rhlC* homologs for the biosynthesis of rhamnolipids**

Looking through their sequenced genomes, we found that both *B. thailandensis* and *B. pseudomallei* harbor on their second chromosome two paralogous *rhl* gene clusters carrying genes highly similar to the *P. aeruginosa genes rhlA*, *rhlB* and *rhlC*, which are involved in the biosynthesis of rhamnolipids. Interestingly, in the latter species these three genes are arranged in two physically distant operons, while in the two *Burkholderia* species, they are part of the same gene cluster. The results presented here demonstrate that the purpose of these genes in *B. thailandensis*, and more than likely in *B. pseudomallei*, is for the production of rhamnolipids.

Genes that share similarities with efflux pumps and transporters are also present within the *rhl* gene clusters. There is at least one instance of an efflux system implicated in the transport of a biosurfactant. In the Gram-positive species *Bacillus subtilis*, YerP, a homolog to the resistance-nodulation-cell division (RND) family efflux pumps, was found to be implicated in surfactin resistance (Tsuge *et al.*, 2001). We propose that the other genes present within the *rhl* gene clusters are involved in the transport of rhamnolipids outside the cell; we are currently investigating this hypothesis.

Under our experimental conditions, *B. thailandensis* is capable of producing rhamnolipids with 3-hydroxy fatty acid moieties that are comprised of chains varying from C_{10}-C_{12} to C_{16}-C_{16}. Such long lengths have not been reported for rhamnolipids produced by bacteria other than those of the *Burkholderia* species, with the exception of one publication reporting trace amounts of Rha-Rha-C_{10}-$C_{14:1}$ produced by *P. aeruginosa* 57RP and another describing the production of a C_{14}-C_{10} form by *P. chlororaphis* B-30761 (Déziel *et al.*, 1999; Gunther *et al.*, 2005). Interestingly, the rhamnolipids produced by *B. thailandensis* are predominantly composed of dirhamnolipids, whereas monorhamnolipids and HAAs are only found in much smaller concentrations, nevertheless comprised mostly of the corresponding molecule in the C_{14}-C_{14} chain lengths. The dirhamnolipid versus monorhamnolipid ratio found in this species is

approximately 13, whereas we observe a factor of only 4 in *P. aeruginosa.* One possible explanation is that, unlike *P. aeruginosa* which harbors *rhlA* and *rhlB* in one operon and *rhlC* in another, *Burkholderia* species code for the three enzymes from the same gene cluster, predicted to be an operon. We hypothesize this favors the simultaneous production of all the enzymes of the biosynthetic pathway; hence, RhlC would be present simultaneously and at the same level than RhlB, therefore favoring the immediate addition of the second L-rhamnose unto the monorhamnolipids. Our result adds *B. thailandensis* to the few bacterial species able to produce rhamnolipids, and shows that rhamnolipids produced by *Burkholderias* are more likely to contain longer side chains than those by *Pseudomonas* species, which are predominantly of the C_{10}-C_{10} chain length.

The above mentioned facts are also true for the rhamnolipids produced by *B. pseudomallei.* More specifically, fatty acyl chains with carbon lengths of 12, 14 and 16 were observed in *B. pseudomallei* rhamnolipids, although only dirhamnolipids were detected. While production levels achieve 30 mg/L for *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* can reach 80 mg/L under the same conditions (data not shown). These results demonstrate that rhamnolipid congeners other than the previously described Rha-Rha-C_{14}-C_{14} are also produced by this pathogen.

Inactivation of each of the two *rhl* gene clusters in *B. thailandensis* by making a polar mutation of the two *rhlA* alleles confirmed that both clusters contribute to produce rhamnolipids. Rhamnolipid production is observed even when one of the two alleles is not functional, suggesting that one copy does not depend on the other. However, the production levels attained by each of the *rhlA* mutants show that the gene cluster containing the *rhlA2* allele contributes about two and half more rhamnolipids than the *rhlA1* allele cluster (Fig. 13). Since the promoter sequences of the two *rhl* gene clusters only share approximately 270 bp directly upstream of both of the *rhlA* ATGs and therefore seem to have diverged, these results suggest that each cluster possesses its unique, differently controlled promoter, which is apparently found upstream of this conserved region. The biphasic shape of the wild-type

rhamnolipid production curve supports this conclusion. Furthermore, the addition of both levels of production by the two clusters does not reach the wild type production level. This could be explained by some sort of positive retroaction where rhamnolipids stimulate global production and that the gene clusters are in fact interconnected. Also, it must be considered that the different rhamnolipid production levels attained by the *rhlA* single mutants could also be associated to polar effects on the downstream genes that could possibly interfere with rhamnolipid biosynthesis.

The presence of two paralogous gene clusters is interesting since gene duplication is normally not favored within genomes, as one copy is generally more susceptible to mutations and/or inactivation. However, a duplication event might be preserved if it is immediately beneficial to the organism because of protein dosage effects, e.g. in variable environments (Zhang, 2003; Reams et Neidle, 2004). We therefore extrapolate that the *Burkholderia* species which harbor tandem *rhl* gene clusters have conserved both copies because it must be advantageous for these bacteria to produce extra quantities of rhamnolipids. The requirement of both *rhl* gene clusters for normal swarming motility supports this model (see below). The presence of a transposase of the mutator family in close proximity of one of the gene clusters (BTH_II1082) can also be indicative that a past duplication of an original single copy occurred and positive selection throughout evolution of the bacteria conserved the paralogs.

Long chain rhamnolipids from *Burkholderia:* effects on the CMC

Considering the length of the carbon chains of the fatty acid moiety of rhamnolipids produced by *Burkholderia* species, it was compelling to determine their effect on lowering the surface tension of water. A total rhamnolipid extract from *B. thailandensis* lowers the surface tension to 42 mN/m, with a CMC value of 225 mg/L. These values are higher than those traditionally reported for rhamnolipids produced by *Pseudomonas* species (typically around 30 mN/m and CMC in the order of 20 to 200 mg/L) (Syldatk *et al.*, 1985); however, it is only recently that HAAs have been discovered, as well as their efficacious surface tension-lowering potential (Déziel *et al.*, 2003). Thus, we assume that results pertaining to surface tension

properties of rhamnolipids published prior to this report could have been biased by a contamination with easily co-purified HAAs. For the purpose of the present study, we compared our results with those we have published for purified rhamnolipids and HAAs produced by *P. aeruginosa* PG201 (Déziel *et al.*, 2003). The purified rhamnolipids from this strain lower surface tension to 40 mN/m with a CMC value of approximately 600 mg/L, while the HAA mixtures displays values of 29 mN/m with a CMC of approximately 800 mg/L. Consequently, it is clear that the longer chain rhamnolipids produced by *B. thailandensis* start forming micelles at a much lower concentration than *P. aeruginosa* rhamnolipids, 225 mg/L versus 600 mg/L. These values can be compared as the rhamnolipid mixture from *B. thailandensis* used for our tests contained only traces of HAAs. The effect of alkyl ester chain length of sophorolipids, a class of biosurfactants produced by *Candida bombicola*, has been studied with regards to micellization. The study reported a direct effect of carbon chain length on decreasing the CMC. Additional CH_2 groups render the molecule more hydrophobic and thus facilitate micelle formation (Zhang *et al.*, 2004). This might explain the lower CMC value obtained with the longer chain rhamnolipids produced by *B. thailandensis* in comparison to those obtained by *P. aeruginosa*.

Both *rhlA* alleles are necessary for normal swarming motility

Swarming motility always involves biosurfactants. For example, serrawettin W2, a wetting agent produced by *Serratia liquefaciens*, is required for swarming motility in a nonflagellated mutant (Lindum *et al.*, 1998; Eberl *et al.*, 1999). In regards to *P. aeruginosa*, biosurfactants such as rhamnolipids and HAAs are essential for swarming motility (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007). Only a few studies have reported on swarming motility of *Burkholderia* species, which is at least in part attributed to the lack of knowledge available regarding wetting agents produced by members of this genus. The swarming motility of *B. cepacia* has been observed, and the authors hypothesized that biosurfactants are involved (Huber *et al.*, 2001). We have also recently reported conditions under which *B. thailandensis* can swarm (Lai *et al.*, 2009).

The present study demonstrates that swarming motility of a *B. thailandensis* double *rhlA* mutant is completely prevented. This is in agreement with previous studies showing that inactivation of *rhlA* inhibits swarming by *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). Furthermore, a mutation in any of the two *rhlA* genes hinders swarming of *B. thailandensis*, suggesting that a critical concentration of rhamnolipids is required and that the levels reached when only one of the two gene clusters is functional are not sufficient to allow the bacteria to completely overcome surface tension. The complementation experiment with exogenous addition of increasing concentrations of rhamnolipids further corroborates that there is indeed a critical concentration of biosurfactant necessary for *B. thailandensis* to swarm, and that both *rhl* gene clusters contribute differently to the total concentration of rhamnolipids produced. The cross-feeding experiment suggests that rhamnolipids produced by *B. thailandensis* diffuse to only a short distance in the agar medium surrounding the colony.

2.4.5 Conclusions

The discovery that *B. thailandensis* is capable of producing considerable amounts of long chain dirhamnolipids makes it an interesting candidate for the production of biodegradable biosurfactants with good tensioactive properties. Furthermore, that this bacterium is non-infectious makes it an ideal alternative to the use of the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* for the large scale production of these compounds for industrial applications. Finally, identification of the same paralogous *rhl* gene clusters responsible of the production of long chain rhamnolipids in the closely-related species *B. pseudomallei* might shed some light on the virulence mechanisms utilized by this pathogen during the development of infections.

2.4.6 Methods

Bacteria and culture conditions

The bacterial strains used in this study, *B. thailandensis* E264 (Brett *et al.*, 1998) and *B. pseudomallei* 1026b (DeShazer *et al.*, 1997), were grown in Nutrient Broth (NB; EMD Chemicals) supplemented with 4% glycerol (Fisher) at 34°C on a rotary shaker, unless otherwise stated. *Escherichia coli* SM10 λpir (*thi-1 thr leu tonA lacY supE recA*::RP4-2-Tc::Mu Km^r λ*pir*) served as a donor for conjugation experiments and was grown in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) under the same conditions (Simon *et al.*, 1983). When necessary, 150 μg/ml tetracycline or 100 μg/ml trimethoprim was added for *B. thailandensis* mutant selection.

To follow the production of rhamnolipids by *B. thailandensis* and its *rhlA* mutants, cultures were grown in 50 ml of NB supplemented with 2% glycerol in 500 ml Erlenmeyer flasks at 37°C with gyratory shaking (240 rpm). For *B. pseudomallei*, cultures were carried out in 25 ml of NB supplemented with 4% glycerol in 250 ml Erlenmeyer flasks at 34°C with gyratory shaking (200 rpm).

Rhamnolipid production and extraction

Cultures for high yield rhamnolipid production were grown in 200 ml of NB supplemented with 4% of glycerol or canola oil in 2 L Erlenmeyer flasks at 34°C with gyratory shaking (240 rpm). Extraction of total rhamnolipids was performed as described previously (Déziel *et al.*, 2003), with slight modifications. Briefly, cells were removed from the medium by centrifugation (13,000 × *g*, 15 min) and the supernatant acidified to pH 3-4 with concentrated HCl. The rhamnolipids were then extracted three times with 1/3 of the volume of ethyl acetate. The organic extract was then dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated using a rotary evaporator. The oily residue was finally dissolved in methanol.

Construction of *rhlA* mutants

For the construction of single *rhlA* mutants in *B. thailandensis*, a 464 bp fragment was amplified using primers rhlASVF and rhlASVR, containing *Xba*I and *Kpn*I restriction sites,

respectively (Table 4). The PCR product was cloned by the means of its *Xba*I and *Kpn*I sites into the suicide vector pKNOCK-Tc (Alexeyev, 1999). The construct was transformed into competent *E. coli* SM10 cells by the heat shock method. The plasmid was then mobilized into *B. thailandensis* by mating and transformants were selected on TSB agar plates containing 50 µg/ml gentamicin, 15 µg/ml polymyxin B and 150 µg/ml tetracycline. To verify in which of the two *rhlA* alleles the homologous recombination took place, diagnostic PCRs were conducted using promoter-specific forward primers, rhlA1PF and rhlA2PF, as well as a common reverse primer, rhlAR, located at the end of the 3' regions of both *rhlAs*. Rhamnolipid production of mutants was also quantified (see below) and compared to typical wild type production values.

To inactivate the second *rhlA* allele, targeted mutagenesis through natural transformation of PCR fragments was exploited (Thongdee *et al.*, 2008). Briefly, three fragments corresponding to the regions flanking the specific *rhlA* gene to be deleted and a trimethoprim resistance gene were joined by PCR. The 5' and 3' flanking regions of *rhlA* were amplified using primers rhlA5'2F and rhlA5'2R as well as rhlA3'3F and rhlA3'3R, respectively. The trimethoprim resistance marker was amplified from the pFTP1 plasmid using primers rhlATp1F and rhlATp1R (Choi *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2008). Cells of the single *rhlA* mutant were rendered competent using DM medium and then exposed to various concentrations of the mutagenic PCR fragment. Double *rhlA* mutants were selected on TSB agar containing 150 µg/ml tetracycline and 100 µg/ml trimethoprim. The *B. thailandensis rhlA* double mutant was confirmed by diagnostic PCR to verify proper recombination and insertion of the resistance marker. Absence of rhamnolipid production by LC/MS analysis also served as a confirmation.

Preparation of culture samples for LC/MS analysis

To prepare samples for LC/MS analysis, the culture samples were firstly centrifuged to remove cells (16,000 × *g*, 15 min). To the cell-free supernatant was then added either 16-hydroxyhexadecanoic acid or deuterium-labeled 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-D4) (Lépine *et al.*, 2003) as internal standards used for quantitative measurements, both at a final concentration of 10 mg/L. For *B. pseudomallei*, cell-free supernatants were obtained by

centrifugation (16,000 × *g*, 15 min) followed by filtration on a 0.22 µm filter. Twenty µl of samples were injected for LC/MS analysis. Quantification was performed by integration of the pseudomolecular and the proper fragment ions and the use of dose-response calibration curves using purified rhamnolipids.

Rhamnolipid analysis (LC/MS)

All rhamnolipid quantifications and analyses were performed using a Quattro II (Waters, Mississauga, Ontario, Canada) triple-quadrupole mass spectrometer in negative electrospray ionization mode coupled to an HP 1100 (Agilent Technologies, Saint Laurent, Quebec, Canada) high-performance liquid chromatograph equipped with a 4.6 x 50 mm 300SB-C3 Zorbax 5µm (Agilent) reverse-phase column. The HPLC flow rate was set at 400 µl/min and was split to 10% by the means of a Valco Tee prior to being introduced into the mass spectrometer. An acetonitrile-water gradient containing 2 mM of ammonium acetate was used starting with 25% acetonitrile during the first 5 min, raised to 50% by 18 min and 100% by 19 min. This concentration was held until 22 min, where the initial concentration was resumed and kept until 26 min. Voltage of the capillary was set to 3.5 kV and cone voltage to 30 V. The temperature of the source block was kept at 120ºC. Scan mass range was set from 130 to 940 Da. A calibration curve was performed to determine the long chain rhamnolipid response factor. During LC/MS/MS experimentation, fragmentation of the molecules were induced with argon serving as the collision gas at 2×10^{-3} mTorr.

Enzymatic hydrolysis of rhamnolipids – Naringinase

To study the rhamnolipid congeners produced by *B. thailandensis*, a modified protocol using enzymatic hydrolysis was employed, as described previously (Trummler *et al.*, 2003). Briefly, 100 mg of extracted and purified rhamnolipids were suspended in 5 ml of 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.1. To this solution was added 100 mg of naringinase from *Penicillum decumbens* (Sigma). The mixture was then kept at 50ºC for 2 h with gyratory shaking (240 rpm), at which point 20 ml of buffer were added. After 24 h, another 150 mg of naringinase were added as well as 25 ml of buffer. The reaction was kept under these

conditions for 8 days. A final 50 mg of naringinase in 20 ml of buffer were added to the mixture and was left for another 24 h. Thereafter, the solution was acidified to pH 3-4 using concentrated HCl and extracted three times with ethyl acetate. The fatty acid moieties generated by naringinase cleavage were then analyzed by LC/MS after the extract had been dried and evaporated.

CMC - Surface tension assay

Critical micelle concentration and surface tension were measured by the du Noüy ring method using a surface tensiometer (Fisher). The instrument was calibrated against water and assays were performed in triplicate at room temperature.

Swarming motility

For swarming assays, cultures were grown overnight, diluted in fresh medium and subcultured until OD_{600} ~ 6.0 was reached. Swarm plates were prepared as follows: freshly autoclaved medium consisting of NB supplemented with 0.5% dextrose (Fisher) and 0.5% Bacto-agar (Difco) was poured into standard Petri dishes and dried under laminar flow for 30 min, as before (Lai *et al.*, 2009). Immediately following the drying period, plates were inoculated at their center with 5µl of bacterial culture and placed at 30ºC.

For swarming phenotype restoration, 1, 5, 10 and 25 mg/L of purified *B. thailandensis* E264 rhamnolipids were deposited at the center of respective plates and left to dry for 15 minutes before spot inoculation with swarming-deficient *rhlA* mutant strains. For cross-feeding experiments, either equal parts of the cultures were mixed before being plated at the center on the swarm plate, or cultures were simply spotted side-by-side.

2.4.7 Author's Contributions

ED and DD designed the experiments. DD carried out all experimental procedures and analyzed the data. FL provided critical knowledge in LC/MS experimentation. DEW provided *B.*

pseudomallei samples for LC/MS analysis. DD wrote the manuscript. FL and ED corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

2.4.8 Acknowledgements

Special thanks to Marie-Christine Groleau and Ludovic Vial for insightful comments and technical assistance as well as all members of ED laboratory for helpful discussions. This work was funded by NSERC discovery grants to FL and ED. DD was recipient of a Master's Degree scholarship from The Fondation Armand-Frappier.

2.4.9 References

Consulter la liste de références générale du présent mémoire.

2.4.10 Figures and tables

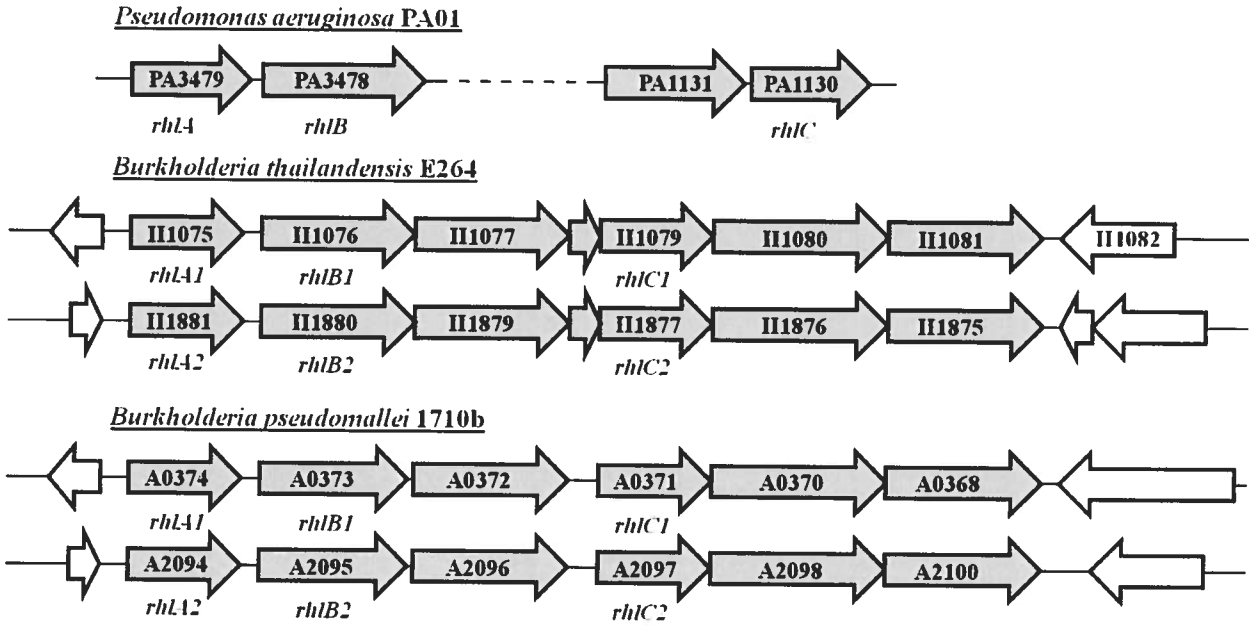
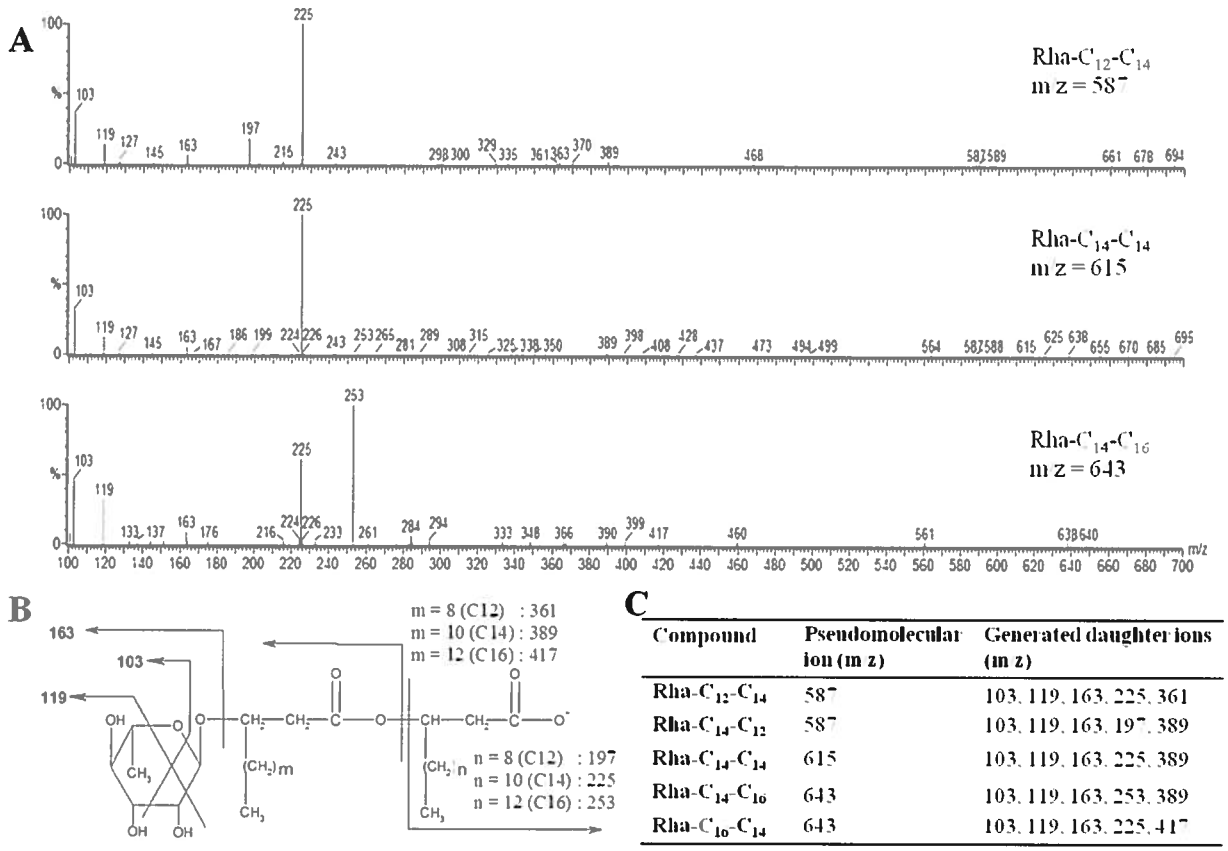


Figure 9. Genetic arrangement of *rhlA*, *rhlB* and *rhlC* in the genomes.

Schematic representation of the bicistronic *P. aeruginosa* PA01 (http://www.pseudomonas.com) regions containing the *rhlAB* and *rhlC* genes as well as the two identical gene clusters containing the homologous *rhlA, rhlB* and *rhlC* genes in *B. thailandensis* E264 and *B. pseudomallei* 1710b (http://www.burkholderia.com).



C

Compound	Pseudomolecular ion (m/z)	Generated daughter ions (m/z)
Rha-C_{12}-C_{14}	587	103, 119, 163, 225, 361
Rha-C_{14}-C_{12}	587	103, 119, 163, 197, 389
Rha-C_{14}-C_{14}	615	103, 119, 163, 225, 389
Rha-C_{14}-C_{16}	643	103, 119, 163, 253, 389
Rha-C_{16}-C_{14}	643	103, 119, 163, 225, 417

Figure 10. Congener analysis of rhamnolipids from *B. thailandensis*

A) Mass spectra of the fragmented *m/z* 587, 615 and 643 pseudomolecular ions of congeners Rha-C_{12}-C_{14}, Rha-C_{14}-C_{12}, Rha-C_{14}-C_{14}, Rha-C_{14}-C_{16} and Rha-C_{16}-C_{14}. B) Schematic representation of observed fragmentation patterns of a monorhamnolipid. C) Daughter ions generated by fragmentation of the specified congeners.

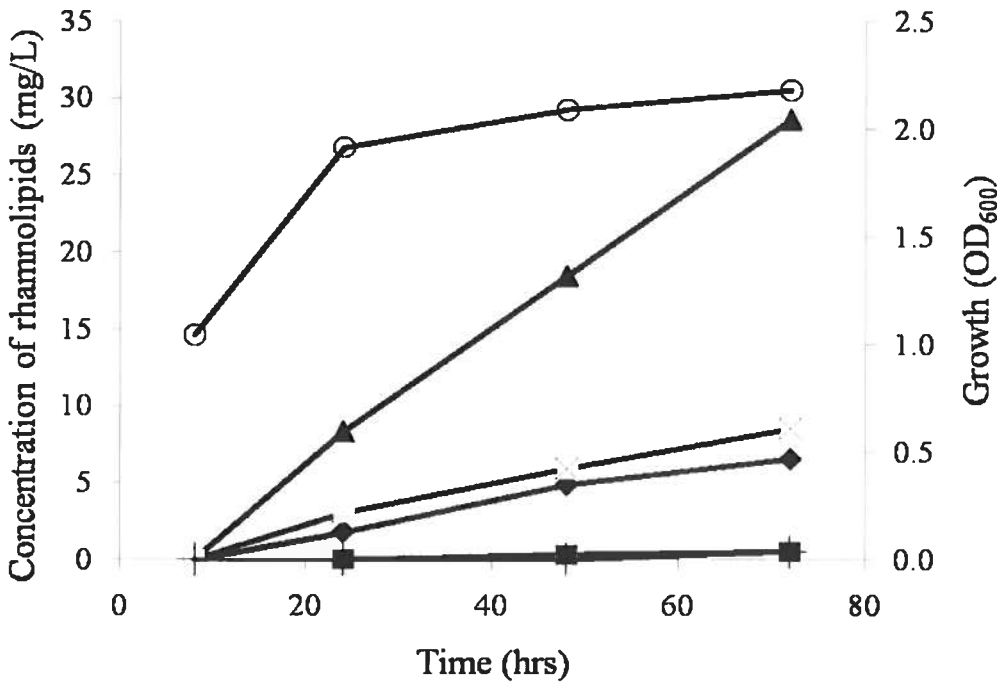


Figure 11. Production of the most abundant dirhamnolipids in a *B. pseudomallei* 1026b culture. Bacteria were grown in NB supplemented with 4% glycerol as carbon source. Rhamnolipids were quantified by LC/MS. Rha-Rha-C_{12}-C_{12} (◆); Rha-Rha-C_{12}-C_{14} (■); Rha-Rha-C_{14}-C_{14} (▲); Rha-Rha-C_{14}-C_{16} (×); Rha-Rha-C_{16}-C_{16} (+); Bacterial growth (o).

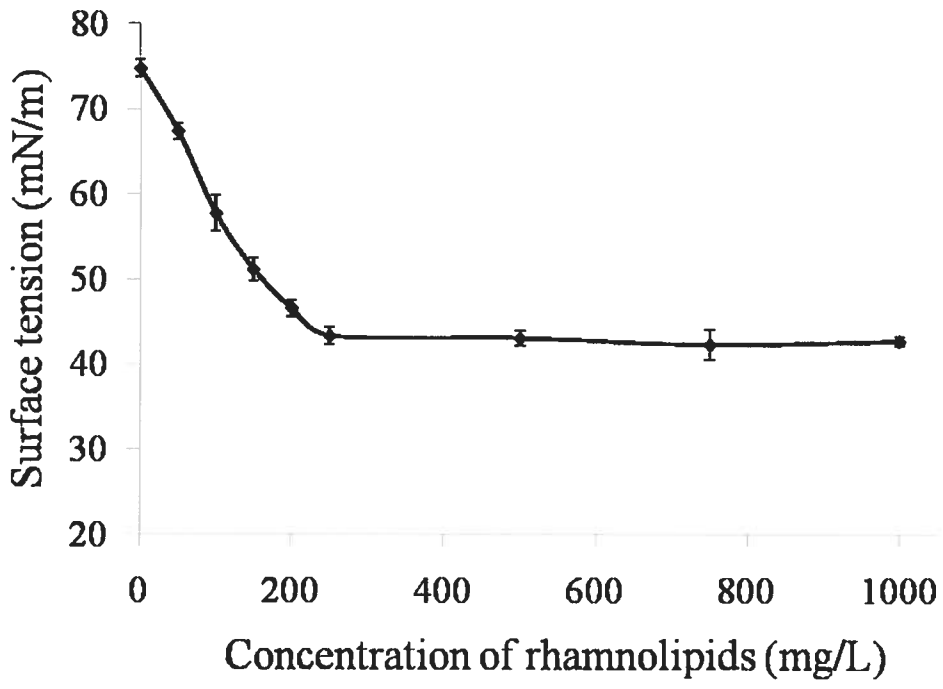


Figure 12. Surface tension and CMC value.

Surface tension of the total mixture of rhamnolipids and HAAs extracted from a *B. thailandensis* E264 culture. Each data point shows the mean of triplicate measurements. Error bars represent the Standard Deviation (SD).

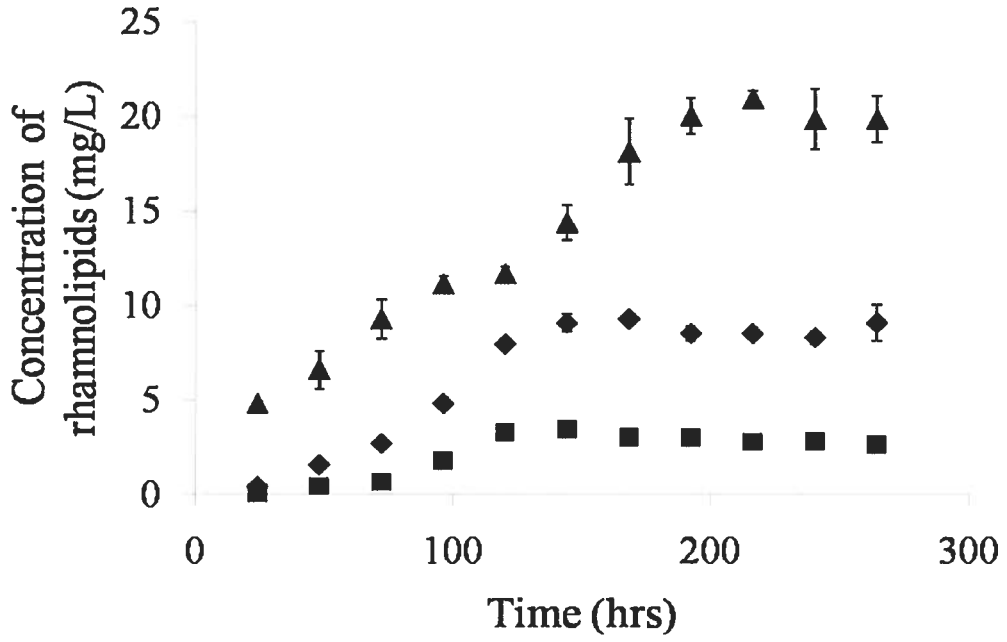


Figure 13. Rhamnolipid production by single *rhlA* mutants.

Total rhamnolipid production by the *B. thailandensis* E264 wild type strain and both single *rhlA* mutant cultures grown in NB with glycerol (2%), as quantified by LC/MS. Each data point shows the mean of triplicate measurements. Error bars represent the SD. WT strain (▲); *rhlA1* mutant (◆); *rhlA2* mutant (■). The double *rhlA1rhlA2* mutant does not produce any rhamnolipids.

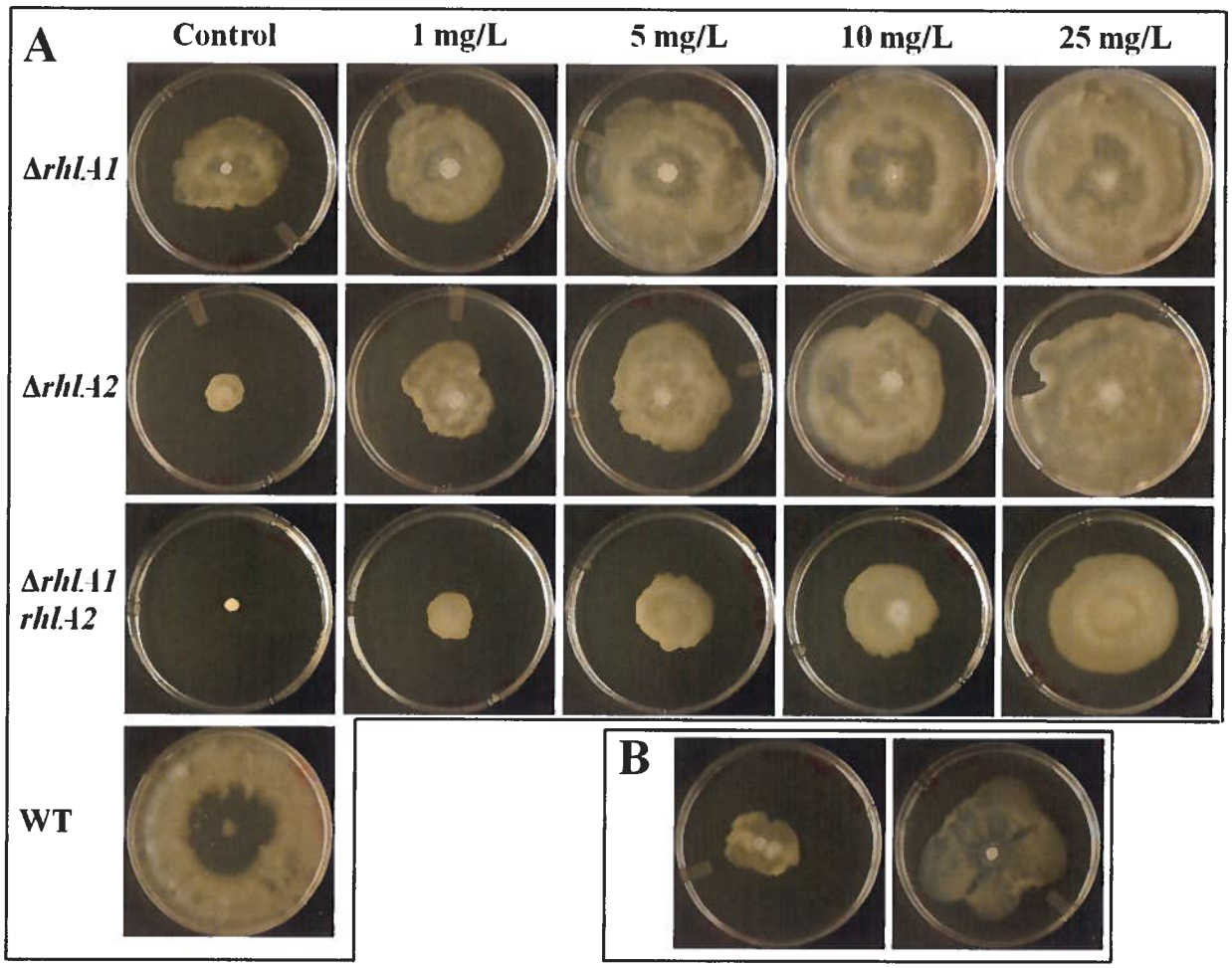


Figure 14. Swarming phenotype restoration within the *rhlA* mutants.

Swarm plates were incubated for 18 h at 30°C with *B. thailandensis* E264 wild type strain, both single *rhlA* mutants as well as the double *rhlA* mutant. Under these experimental conditions swarming motility is normally favored, as observed with the wild type strain. Experiments were done in triplicate. A) Swarming phenotype restoration of the *rhlA* mutants with addition of 1, 5, 10 and 25 mg/L of exogenous purified rhamnolipids. B) Cross-feeding experimentation with both *rhlA*- single mutants. Left: mutants placed side-by-side; Right: mutants mixed before plating.

Table 4. Primers used in this study.

Primer Name	Primer Sequence (5′ to 3′)
rhlASVF	GCTCTAGAAGACGGTCATCCTCGTGAAC[1]
rhlASVR	GGGGTACCCGGCAGCTTCGTCAGATAC[1]
rhlA1PF	GGAAATGGTCGATGGGTATG[2]
rhlA2PF	GGCGACGGATAGCGATAAG[2]
rhlAR	TCGTGTACTCGTCCAGCTC
rhlATp1F	GGCGGAATTCCGGCAGGTACTGCTCCGGCCGCATCGAC AGGATCTGGTCCGAGCTCGAATTAGCTTCAAA
rhlATp1R	TGCCGCGGATCATGAAGCTGTACAACTACCGGTATCTGA CGAAGCTGCCGGAGCTCGAATTGGGGATCTT
rhlA5′2F	GTGGTCGTGAAAGCGGAAT
rhlA5′2R	CGGCAGCTTCGTCAGATAC
rhlA3′3F	GACCAGATCCTGTCGATGC
rhlA3′3R	CTCGATCAGCGTCATCAGC

[1] Restriction sites designed into the primers are underlined.

[2] Primers are constructed upward of the consensus sequence of the two promoters.

Table 5. Predicted functions of the remaining ORFs.

Gene annotation	Predicted function[1]
PA1131	Probable Major Facilitator Superfamily (MFS) Transporter
BTH_II1077 / BTH_II1879	Drug Resistance Transporter, EmrB/QacA Family
BTH_II1078 / BTH_II1878	Hypothetical Protein
BTH_II1080 / BTH_II1876	RND Efflux System, Outer Membrane Lipoprotein, NodT Family
BTH_II1081 / BTH_II1875	Multidrug Resistance Protein (EmrA)
BURPS1710b_0372 / BURPS1710b_2096	Multidrug Resistance Protein (BcrA)
BURPS1710b_0370 / BURPS1710b _2098	RND Efflux System, Outer Membrane Lipoprotein, NodT Family
BURPS1710b_0368 / BURPS1710b _2100	Multidrug Resistance Protein (EmrA)

[1] Predicted functions from http://www.pseudomonas.com and http://www.burkholderia.com.

Predicted functions of the remaining ORFs present in the *rhl* gene cluster in *B. thailandensis* and *B. pseudomallei*, including the one adjacent to *rhlC* in *P. aeruginosa*

Table 6. Maximal production and relative abundance of the HAAs and rhamnolipids produced by *B. thailandensis* E264.

HAA/Rhamnolipid	Pseudomolecular ion	Production (mg/L)		Relative abundance (%)[1]	
		Glycerol	Canola oil	Glycerol	Canola oil
C_{10}-C_{12}	385	N/D[2]	4.59	-	-
C_{12}-C_{12}	413	N/D	N/D	-	-
C_{12}-C_{14}	441	N/D	N/D	-	-
C_{14}-C_{14}	469	N/D	N/D	-	-
C_{14}-C_{16}	497	N/D	N/D	-	-
C_{16}-C_{16}	525	1.60	7.05	-	-
Rha-C_{10}-C_{12}	531	N/D	0.98	0.00	0.07
Rha-C_{12}-C_{12}	559	0.57	6.48	0.14	0.44
Rha-C_{12}-C_{14}	587	1.86	13.75	0.45	0.94
Rha-C_{14}-C_{14}	615	24.37	94.53	5.84	6.47
Rha-C_{14}-C_{16}	643	1.16	5.42	0.28	0.37
Rha-C_{16}-C_{16}	671	N/D	N/D	0.00	0.00
Rha-Rha-C_{10}-C_{12}	677	0.75	7.44	0.18	0.51
Rha-Rha-C_{12}-C_{12}	705	7.41	49.43	1.77	3.38
Rha-Rha-C_{12}-C_{14}	733	28.48	179.73	6.82	12.29
Rha-Rha-C_{14}-C_{14}	761	321.42	1021.20	76.99	69.85
Rha-Rha-C_{14}-C_{16}	789	31.24	82.37	7.48	5.63
Rha-Rha-C_{16}-C_{16}	817	0.26	0.73	0.06	0.05
Total		419.10	1473.72		

[1] Relative abundance of rhamnolipids only.

[2] N/D: Not detected.

Cultures were grown on 4% glycerol and canola oil as respective carbon sources. LC/MS analysis was performed after 13 days of incubation at 37°C.

Chapitre III - Méthodologie et résultats supplémentaires

Le présent chapitre a pour but de présenter les résultats supplémentaires du projet de recherche qui n'ont pas été rapportés dans l'article scientifique. En premier lieu, on y retrouve des tableaux récapitulatifs des nombreuses souches bactériennes et des différents mutants utilisés au cours du projet. Par la suite, les méthodes employées pour l'identification de la présence de rhamnolipides, ou de biosurfactants en général, sont présentées. Ensuite, les différents sous-projets portant sur les rhamnolipides sont décrits, soit l'étude de leur production chez quelques espèces de *Burkholderia*, l'étude de leur efflux chez *B. thailandensis* et *P. aeruginosa*, l'étude de leur production et de leur virulence *in vivo*, l'étude de l'effet des rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* sur *B. thailandensis*, l'étude d'une co-culture de *P. aeruginosa rhlA-* et *rhlC-* et finalement, l'étude du lien entre le QS et la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

3.1 Résumé des souches bactériennes et des mutants utilisés au cours du projet

Plusieurs espèces de *Burkholderia* ont été testées au cours de ce projet pour leur potentiel de produire des rhamnolipides. Ces souches sont décrites dans le tableau 7. Comme mentionné dans le chapitre portant sur l'article scientifique, la souche principale utilisée pour les nombreux tests de caractérisation des rhamnolipides est *B. thailandensis* E264.

Tableau 7. Identification des souches utilisées au cours du projet ainsi que leurs provenances.

Souche	Source et provenance[1]	Référence
***B. thailandensis* E264**	Sol, Thaïlande	(Brett *et al.*, 1998)
***B. pseudomallei* 1026b**	Souche clinique	(DeShazer *et al.*, 1997)
***B. mallei* ATCC 23344**	Mulet, Chine	(DeShazer *et al.*, 2001)
***B. ambifaria* HSJ1**	FK, Canada	(Vial *et al.*, 2008)
***B. cenocepacia* CEP0511**	FK, Australie	(Mahenthiralingam *et al.*, 1996)
***B. cenocepacia* CEP0565**	FK, Royaume-Unis	(Govan *et al.*, 1993)
***B. cenocepacia* LMG18829**	FK, États-Unis	(LiPuma *et al.*, 1988)
***B. cenocepacia* LMG19240**	Blé, Australie	(Vandamme *et al.*, 2003)
***B. cenocepacia* K56-2**	FK, Canada	(Darling *et al.*, 1998)
***P. aeruginosa* PA14**	Souche clinique	(Rahme *et al.*, 1995)

[1] FK : Souche isolée d'un patient atteint de fibrose kystique.

P. aeruginosa PA14 ainsi que ses mutants *rhlA*-, *rhlB*- et *rhlC*- ont servi à des tests visant l'étude de la possibilité d'incorporation par ces mutants de dilipides ou des rhamnolipides exogènes. En plus du mutant *fliC*-, des tests de chimiotactisme ont été effectués. Finalement, *PA14_49750*- a été étudié pour son rôle potentiel dans l'efflux des rhamnolipides. La souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14 et quelques autres espèces de *Burkholderia* ont aussi été testées pour leur production de rhamnolipides *in vivo* à l'aide du modèle d'infection *Galleria mellonella*. Entre autres, les mutants *rhlA*- de *B. thailandensis* (cette étude) ont été testés pour vérifier la virulence de ces bactéries ne produisant pas de rhamnolipides. Les divers mutants utilisés au cours de toutes ces expériences sont énumérés dans le tableau 8.

Tableau 8. Listes de mutants utilisés au cours du projet.

Mutant	Précision et marqueur de résistance	Référence
***B. thailandensis* E264**		
rhlA1-	Mutation polaire du gène *rhlA* BTH_II1075 (Tc)	Cette étude
rhlA2-	Mutation polaire du gène *rhlA* BTH_II1881 (Tc)	Cette étude
rhlA1/rhlA2-	Double mutation polaire des deux gènes *rhlA* (BTH_II1075 et BTH_II1881) (Tc et Tp, respectivement)	Cette étude
hmqA-	Mutation polaire non-marquée	(Vial *et al.*, 2008)
btaI2-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler *et al.*, 2009)
btaR2-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler *et al.*, 2009)
btaI1,3-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler *et al.*, 2009)
btaI1,2,3-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler *et al.*, 2009)
***P. aeruginosa* PA14**		
rhlA-	Mutation polaire (par transposon) (Gm)	(Liberati *et al.*, 2006)
rhlB-	Mutation polaire (par transposon) (Gm)	(Liberati *et al.*, 2006)
rhlC-	Insertion cassette de résistance dans *rhlC* (Tc)	Julien Tremblay (non publié)
PA14_49750-	Mutation polaire (par transposon) dans la pompe prédite adjacente à *rhlC* (Gm)	(Liberati *et al.*, 2006)
fliC-	Mutation polaire (par transposon) (Gm)	(Liberati *et al.*, 2006)

Tc : Tétracycline

Tp : Triméthoprime

Gm : Gentamycine

3.2 Méthodes directes et indirectes utilisées pour détecter la présence de rhamnolipides

3.2.1 Tests d'abaissement de la tension de surface

Plusieurs tests peuvent être utilisés pour vérifier s'il y a présence de biosurfactants dans un échantillon. Le premier test, basé sur la méthode de l'anneau de Noüy (du Noüy, 1922), permet d'identifier la présence d'agents tensioactifs grâce à une diminution de la tension de surface. Normalement, un échantillon composé d'eau pure possède une tension de surface de 71-76 mN/m, selon la température à laquelle les mesures sont prises (Munson *et al.*, 2007). C'est une méthode indirecte puisqu'elle ne permet pas de confirmer la présence de rhamnolipides, mais seulement d'un composé tensioactif.

Une approche similaire peut être effectuée à l'aide du « drop collapse test ». Cette méthode consiste à étendre uniformément une substance liquide hydrophobe, comme l'huile de chauffage, sur une plaque contenant des légères indentations concaves. Un volume de l'échantillon à tester est déposé au centre de ces dernières. Si la goutte s'étend, on a une indication de la présence de biosurfactants. Un échantillon qui ne contient pas de molécules tensioactives verra sa goutte garder sa forme.

3.2.2 Analyses par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (CL/SM)

Puisque les rhamnolipides ont été caractérisés au niveau structurel chez *P. aeruginosa*, il est facile de déduire la masse moléculaire des différents congénères par analyse spectrométrique en CL/SM. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (HPLC, en anglais) permet de séparer des molécules en fonction de leur polarité en les adsorbants sur une colonne contenant une phase hydrophobe à l'aide de solvants chimiques de polarité décroissante. Donc, plus la molécule est non-polaire, plus elle est retenue sur la colonne. Plus précisément, plus les chaînes d'acide gras d'un rhamnolipide sont longues, plus cette molécule sera éluée tardivement dans le gradient d'élution.

On peut donc chercher dans les spectres de masse résultants d'une analyse d'échantillon les ions spécifiques des ions pseudomoléculaires présentés dans le tableau 9. Les ions ainsi trouvés peuvent par la suite être analysés plus en détail par leurs profils de fragmentation. Les paramètres opérationnels utilisés ainsi que la méthode de quantification des rhamnolipides sont présentés dans la section « Methods » de l'article scientifique.

Tableau 9. Ions pseudomoléculaires correspondant aux principaux congénères à chaînes courtes et à chaînes longues retrouvés chez *Pseudomonas* et *Burkholderia*, respectivement.

HAA/Rhamnolipide	Ion pseudomoléculaire
C_8-C_8	301
C_8-C_{10}	329
C_{10}-C_{10}	357
C_{10}-C_{12}	385
C_{12}-C_{12}	413
C_{12}-C_{14}	441
C_{14}-C_{14}	469
C_{14}-C_{16}	497
C_{16}-C_{16}	525
Rha-C_8-C_8	447
Rha-C_8-C_{10}	475
Rha-C_{10}-C_{10}	503
Rha-C_{10}-C_{12}	531
Rha-C_{12}-C_{12}	559
Rha-C_{12}-C_{14}	587
Rha-C_{14}-C_{14}	615
Rha-C_{14}-C_{16}	643
Rha-C_{16}-C_{16}	671
Rha-Rha-C_8-C_8	593
Rha-Rha-C_8-C_{10}	621
Rha-Rha-C_{10}-C_{10}	649
Rha-Rha-C_{10}-C_{12}	677
Rha-Rha-C_{12}-C_{12}	705
Rha-Rha-C_{12}-C_{14}	733
Rha-Rha-C_{14}-C_{14}	761
Rha-Rha-C_{14}-C_{16}	789
Rha-Rha-C_{16}-C_{16}	817

3.3 Études de la production de rhamnolipides chez quelques espèces de *Burkholderia*

3.3.1 Identification d'espèces de *Burkholderia* possédant les gènes de biosynthèse des rhamnolipides

Plusieurs recherches bioinformatiques ont tout d'abord été effectuées pour élucider la présence de gènes de biosynthèse de rhamnolipides chez des espèces de *Burkholderia* (http://www.burkholderia.com) par homologie avec ceux retrouvés chez *P. aeruginosa* (http://www.pseudomonas.com). Deux études ont déjà rapporté la présence d'un Rha-Rha-C_{14}-C_{14} chez *B. pseudomallei* (Häußler *et al.*, 1998) et *B. plantarii* (Andrä *et al.*, 2006), ce qui nous indique la possibilité que d'autres espèces de ce genre soient aussi productrices de ces biosurfactants. Des analyses d'alignement de séquences génomiques et protéiques, blastn et blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), respectivement, de gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* de *P. aeruginosa* ont été effectuées contre plusieurs espèces de *Burkholderia.*

La présence des trois gènes *rhl,* (sous forme d'opéron) a été confirmée dans cinq espèces de *Burkholderia* au total. En plus des espèces *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* qui ont été présentées dans l'article scientifique dans le chapitre deux du présent document, les souches *B. mallei, B. ambifaria* et *B. cenocepacia* possèdent des gènes de biosynthèse de rhamnolipides sur leur deuxième chromosome. Cependant, ces deux dernières espèces ne possèdent qu'une seule copie des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* tandis que deux copies identiques sont retrouvés chez *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei.*

3.3.2 Le cas de *B. mallei*

Tout comme *B. thailandensis* et *B. pseudomallei*, *B. mallei* possède aussi deux copies identiques des gènes *rhl* sur son deuxième chromosome et ce, dans la même organisation génétique que chez ces deux premières espèces. Cependant, aucune trace de rhamnolipide n'a été observée chez *B. mallei* lorsque cultivée dans les mêmes conditions de culture que *B. pseudomallei*. Vraisemblablement, cette absence de rhamnolipides est probablement associée

au milieu de culture utilisé lequel ne serait pas optimisé pour cette bactérie. Alternativement, *B. mallei* aurait perdu sa capacité de produire des rhamnolipides à cause d'une adaptation environnementale. Comme mentionné dans la revue de littérature, il est possible que la divergence des facteurs de virulence utilisés par ces trois espèces soit simplement attribuée à une adaptation de leur génome aux stratégies utilisées pour survivre dans leur niche écologique respective (Kim *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2008).

3.3.3 Essais de divers conditions et milieux de culture pour la production de rhamnolipides par les espèces *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*

B. ambifaria ainsi que différentes souches de *B. cenocepacia* (Tableau 7) ont été mises en cultures dans divers milieux liquides connus pour stimuler la production de rhamnolipides. Il a été confirmé par des analyses bioinformatiques que toutes ces souches contiennent sur leur deuxième chromosome les gènes de biosynthèses de rhamnolipides. Des milieux de croissances riches et pauvres ainsi que différentes sources de carbone ont été testés. Les milieux « Nutrient Broth » (NB) (EMD Chemicals), « Tryptic Soy Broth » (TSB) (Difco), « Brain Heart Infusion » (BHI) (Oxoid), AB minimal et le milieu solide « Columbia Agar » (Quelab) ont ainsi été utilisées. Se référer à l'annexe pour la recette du milieu minimal AB. De plus, le mannitol, le fructose, le glycérol et le dextrose ainsi que l'huile de canola ont également été testé comme différentes sources de carbone ajoutées à ces milieux pour essayer de stimuler une production de biosurfactants.

De façon générale, les sources de carbone ont été ajoutées aux milieux de culture à raison de 4% vol/vol. Le volume de milieu utilisé est fixé à 10% du volume du contenant choisi, que ce soit en Erlenmeyer ou en tube de culture, afin de permettre une bonne oxygénation. Des pré-cultures des différentes souches testées ont servi d'inoculum frais pour les expériences. Les cultures ont été placées à 30°C et 37°C. Les essais en milieux liquides ont été soumis à une agitation constante de 240 rpm.

Aucune évidence de rhamnolipides n'a été retrouvée pour les souches de *B. ambifaria* ni les souches de *B. cenocepacia* par analyses CL/SM. Il est possible qu'un biosurfactant autre que

rhamnolipidique soit produit par ces souches, toutefois les divers tests indirects pour l'identification de biosurfactants (Section 3.2) n'étaient aussi pas concluants.

3.3.3.1 Milieu sputum artificiel

Puisque les milieux de cultures de base utilisés pour la production de biosurfactants chez *B. cenocepacia* et *B. ambifaria* n'ont pas été efficaces, l'utilisation d'un milieu représentatif de l'environnement lors d'une infection pulmonaire a été tentée. Il est possible que ces deux souches ne produisent seulement ces molécules tensioactives que lorsqu'elles le « jugent » nécessaires. En d'autres mots, les biosurfactants sont connus pour être des facteurs de virulence. Il est donc possible qu'ils soient uniquement sécrétés dans des cas d'infections. Le milieu dit de « sputum artificiel » a été utilisé pour essayer de reproduire cette situation (voir annexe pour la recette de ce milieu). Tout comme pour les autres milieux, le volume de milieu utilisé est fixé à 10% du volume du contenant choisi et des pré-cultures des souches testées servent d'inoculum frais pour les expériences. Les cultures sont placées à 30°C et 37°C avec une agitation constante de 240 rpm. Encore une fois, aucune évidence de biosurfactants n'a été détectée lors de ces essais.

3.3.4 Essais swarming de quelques souches de *B. cenocepacia*

Il est connu que dans plusieurs cas les biosurfactants sont absolument nécessaires pour le swarming d'une espèce. Ainsi, en parallèle aux essais en culture liquide, quelques souches de *B. cenocepacia* ont été testées pour cette forme de motilité bactérienne sur divers milieux solides différents incluant NB, BHI et AB. Les bactéries ont été cultivées en milieu frais jusqu'à DO=6.0. Par la suite, 5µl de ces cultures bactériennes ont été déposées au centre des pétris respectifs et supplémenté avec 0.5% dextrose et 0.5% de Bacto-agar (Difco), qui ont été séchés pendant 30 minutes sous la hotte laminaire. Ces pétris ont été placés à 30°C et 37°C et suivis pendant quelques jours. L'observation d'une translocation bactérienne sur la surface des pétris est indicatif du swarming et d'une production de biosurfactant chez l'espèce. La figure 15

montre le résultat des essais de swarming de *B. cenocepacia* CEP0511, CEP0565 et LMG19240 sur milieu NB.

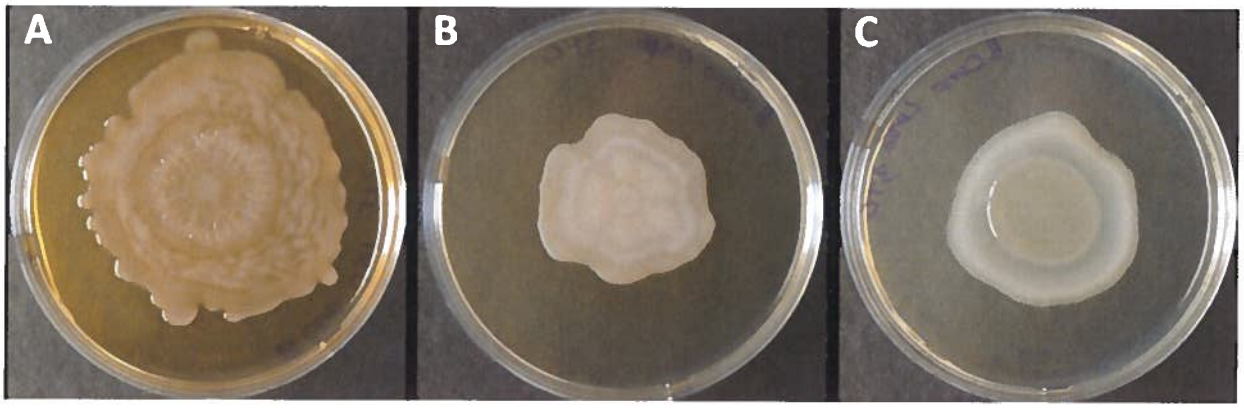


Figure 15. Swarming de trois souches de *B. cenocepacia* sur milieu NB + 0.5% dextrose + 0.5% agar. Pétris placés à 37°C pendant 5 jours. A) *B. cenocepacia* CEP0511* B) *B. cenocepacia* CEP0565 C) *B. cenocepacia* LMG19240.

* Le pétri en **A** semble plus jaunâtre/brunâtre que les deux autres car *B. cenocepacia* CEP0511 produit un pigment brun.

On peut observer sur cette figure que les trois souches de *B. cenocepacia* testées sont capables d'effectuer le swarming sur un milieu solide NB, ce qui suppose la production d'un biosurfactant chez cette espèce. Ces résultats sont représentatifs et typiques de tous les essais effectués à l'exception de ceux utilisant le milieu AB qui ne semble pas stimuler ni le swarming ni la croissance de ces souches. Il semble que les *Burkholderia* préfèrent les milieux riches et non les milieux pauvres. Il est à noter que la motilité swarming de *B. ambifaria* n'a pas été testée au cours de ce projet mais reste toutefois envisageable dans les travaux futurs. Il sera intéressant de vérifier si cette dernière présente les mêmes résultats contradictoires que *B. cenocepacia* en ce qui concerne une absence de production de biosurfactants détectables mais une motilité swarming positive.

3.3.5 Études génétiques approfondies chez *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*

À la suite des nombreux tests négatifs pour l'identification de rhamnolipides chez *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*, des études génétiques approfondies ont été faites. Le but de ces études est d'investiguer la raison pour laquelle ces deux souches, qui possèdent pourtant les gènes *rhl* selon les tests bioinformatiques préliminaires, ne semblent pas produire des rhamnolipides, et ce, dans les nombreuses conditions de culture testées.

Contrairement à *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei*, *B. ambifaria* et *B. cenocepacia* possèdent un gène additionnel entre leurs gènes *rhlA* et *rhlB* (Figure 16). Ce gène a la fonction prédite d'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase putative, une modification post-traductionnelle. Nous soupçonnons que ce petit gène d'environ 570 pb interfère, par un mécanisme inconnu, avec la production de rhamnolipides chez ces souches. La manipulation génétique de *Burkholderia* étant relativement nouvelle, une méthode simple de créer des mutations non-polaires n'est pas encore disponible. Cependant, une mutation polaire de cet intriguant petit gène chez *B. ambifaria* et *B. cenocepacia* pourrait possiblement permettre l'identification de dilipides puisque leur gène *rhlA* respectif serait encore fonctionnel.

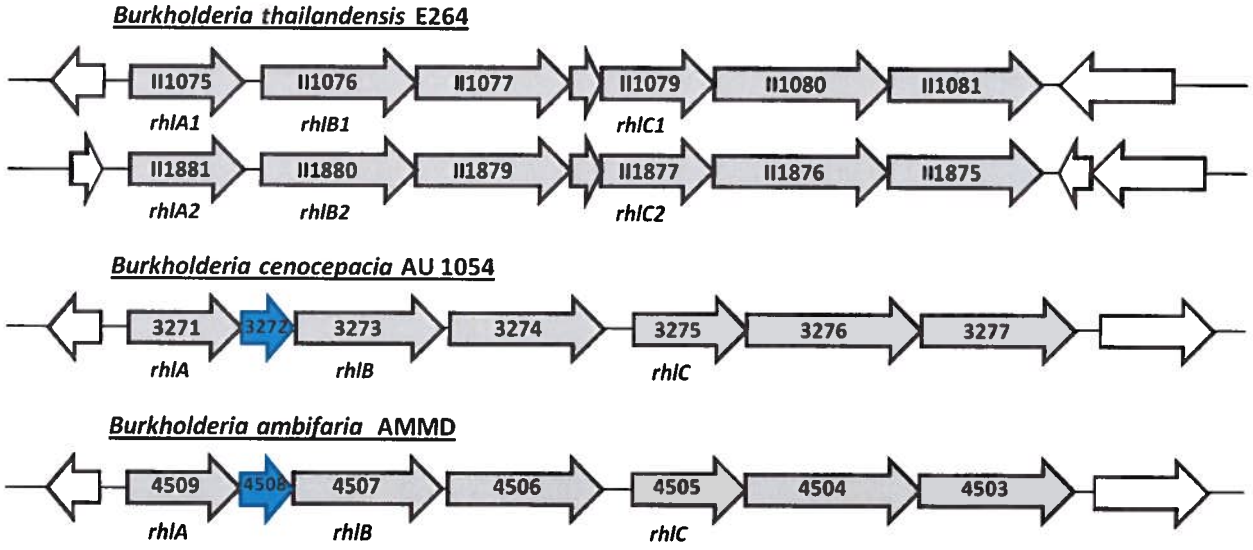


Figure 16. Alignement des regroupements de gènes *rhl* présents chez *B. thailandensis* E264, *B. cenocepacia* AU 1054 et *B. ambifaria* AMMD (http://www.burkholderia.com). Il est possible de voir ici qu'il y a présence d'un gène additionnel (en bleu) en *aval* des gènes *rhlA* chez *B.*

cenocepacia et *B. ambifaria*. Ce gène a une fonction prédite d'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase putative.

3.4 Étude de l'efflux des rhamnolipides chez *B. thailandensis* et *P. aeruginosa*

Il est déjà connu que les rhamnolipides sont des molécules sécrétées à l'extérieur de la cellule puisqu'on les retrouve dans le surnageant. Toutefois, les mécanismes de cet efflux ne sont pas encore élucidés. L'organisation génomique de l'opéron contenant *rhlC* chez *P. aeruginosa* PAO1, révèle qu'il y a présence d'un gène en *amont* de ce dernier (Figure 9). La fonction prédite de ce gène, *PA1131*, serait d'être un transporteur de la classe des « major facilitator superfamily » (MFS) et il pourrait donc être impliqué dans le transport des rhamnolipides. On retrouve également des gènes codant des transporteurs et/ou des pompes à l'intérieur des regroupements de gènes *rhl* chez les *Burkholderia* dont les fonctions prédites de ces gènes chez *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* sont résumées dans le tableau 5. Ces types de transporteurs et pompes sont aussi retrouvés chez *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*.

En 2006, une équipe de chercheur a effectué une banque non redondante de mutants de *P. aeruginosa* PA14 par la technique de mutagénèse aléatoire par transposon pour ainsi faciliter l'étude de cette espèce. Ces mutants polaires incorporent dans leur génome une résistance à la gentamycine et tous les sites d'insertion de ces mutations ont été vérifiés (Liberati *et al.*, 2006). Nous avons eu accès à cette banque de mutants ainsi qu'au mutant du gène homologue à *PA1131* de PAO1, le gène *PA14_49750* de PA14 qui est aussi un transporteur probable. L'emplacement de ce mutant dans la banque est désigné PAMr_nr_mas_08_3 : A10. Ce gène fait 1269 pb et le transposon se situe à 817 pb du début du gène (http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi).

Nous avons testé ce mutant ainsi que la souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14 en triplicata dans 3 ml du milieu SW1/10F supplémenté avec 3% mannitol (voir annexe pour recette). Le milieu SW1/10F est connu pour la stimulation de la production de rhamnolipides

chez *P. aeruginosa*. Les cultures du mutant furent effectuées en présence de 15 µg/ml de gentamycine. Les cultures ont été placées à 37°C et mises sous agitation constante pendant 16 heures. La figure 17 démontre les résultats des analyses CL/SM de ces échantillons.

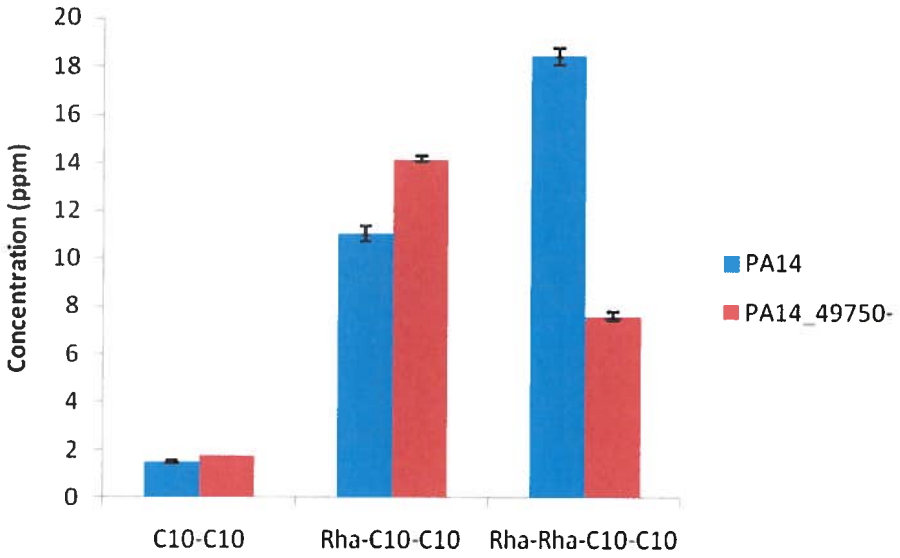


Figure 17. Niveaux de production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{10}-C_{10}) par la souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14 et du mutant *PA14_49750-*.

Les résultats présentés ci-haut montrent qu'il y a production de l'HAA C_{10}-C_{10} chez le mutant *PA14_49750-* à un niveau comparable à celui de la souche sauvage, ce qui est normal puisque *rhlA* est encore actif. Cependant, il y a une légère surproduction du monorhamnolipide correspondant chez ce mutant. Compte tenu des écarts du triplicata, cette différence semble significative, mais reste inexplicable pour le moment. Normalement une mutation polaire du gène *PA14_49750* devrait inactiver *rhlC* et inhiber la production de ce dirhamnolipide. Cependant, les résultats démontrent une production encore importante de dirhamnolipide pour le mutant. La concentration de dirhamnolipides atteinte par *PA14_49750-* est toutefois deux fois moindre que chez la souche sauvage. Ce résultat peut être expliqué par une mutation ratée de PA14_49750 ou par le fait que la mutation, bien que théoriquement polaire, permette

encore une certaine transcription de *rhlC*. Si on tient compte de la production légèrement diminuée de dirhamnolipide, on peut soupçonner que la plus grande production de monorhamnolipide chez le mutant serait attribuable au fait que la transformation des monorhamnolipides en dirhamnolipides est plus lente et non favorisée par la transcription réduite de *rhlC* par rapport à la souche sauvage. Un séquençage du gène muté serait nécessaire pour valider cette hypothèse.

Chez les espèces de *Burkholderia* contenant des gènes homologues à *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*, trois gènes reliés à des systèmes de transport ont aussi été trouvés dans ces regroupements de gènes (Tableau 5). Ceci est vrai aussi pour les espèces *B. cenocepacia* et *B. ambifaria* (Figure 16). L'étude de l'implication de ces gènes dans l'efflux des rhamnolipides chez ces espèces serait fort intéressante. Toutefois, en raison des deux copies identiques du regroupement de gènes *rhl* chez *B. thailandensis* et compte tenu du peu de techniques disponibles pour la création de mutants non-polaires chez ce genre de bactéries, cette étude n'a pas été réalisée dans le cadre de ce projet.

3.5 Étude de la production de rhamnolipides *in vivo* à l'aide d'un modèle d'infection alternatif – *Galleria mellonella*

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a été publiée sur la production de rhamnolipides *in vivo* sauf une qui avait rapporté la présence de ces molécules dans le sputum des personnes atteintes de la fibrose kystique (Kownatzki *et al.*, 1987). Il était donc intéressant de vérifier s'il y avait production de rhamnolipides par *P. aeruginosa* et *B. thailandensis* lors d'infections dans un modèle d'infection alternatif, *Galleria mellonella*. Cet insecte a été infecté au stade larvaire.

Des cultures de 12h (3 ml NB + 4% glycérol pour *B. thailandensis* et 3 ml SW1/10F + 3% mannitol pour *P. aeruginosa*), ont été diluées (DO_{600}=0.5) dans du milieu frais et placées à 37°C jusqu'à DO_{600}=3.0. Par la suite, des dilutions 1/2000 ont été effectuées dans du $MgSO_4$ 10 mM pour chacune des souches. Un volume de 5 µl de cette dilution a été injecté à chaque larve

(n=10) en parallèle avec un groupe contrôle recevant le même volume d'une solution de $MgSO_4$ à 10 mM. Le site d'infection est situé sous la troisième patte antérieure gauche de la larve. Deux échantillonnages de ces larves ont été effectués; 50% des larves ont été récupérées à 24h post-injection et l'autre 50% à 24h post-*mortem*, et ce pour les trois groupes. Aucune mortalité n'a été observée chez les larves après 24h post-injection dans les trois groupes bien qu'après 48-72h toutes les larves infectées sont mortes. Aucune mortalité n'a été observée dans le groupe contrôle. Les larves ont ensuite été broyées dans quelques microlitres de $MgSO_4$ stérile afin d'en faire une purée. Ces six échantillons ont été acidifiés avec une goutte d'HCl concentré, extraits trois fois à l'acétate d'éthyle, les phases organiques récupérées puis évaporées sous jet d'azote et finalement resuspendues dans du méthanol. Les échantillons ont été analysés par CL/SM.

Pour les deux espèces bactériennes la production *in vivo* de rhamnolipides a été observée. Pour *P. aeruginosa*, la quantité de rhamnolipide Rha-Rha-C_{10}-C_{10} récupérée dans l'échantillon de larve 24h post-*mortem* a été de près de 10 µg/g de larve (ppm). Chez *B. thailandensis*, près de 3 ppm de Rha-Rha-C_{14}-C_{14} ont été détectés dans le groupe de larves correspondant (24h post-*mortem*). Les larves du groupe post-*mortem* avaient des concentrations plus grandes de rhamnolipides alors que les larves récupérées après 24h post-infection n'avaient que des quantités très basses. Ceci peut simplement être dû au fait que dans le groupe 24h post-*mortem* les bactéries ont eu plus de temps pour produire des rhamnolipides. De plus, les larves étant mortes, leur système de défense ne peut plus lutter contre l'infection, ce qui devrait faciliter la prolifération bactérienne par rapport à l'autre groupe.

Il est à noter que la production de rhamnolipides par les souches de *B. cenocepacia* a aussi été vérifiée *in vivo* à l'aide de ce modèle d'infection. Toutefois, aucun biosurfactant n'a été détecté non plus de cette manière pour ces souches.

3.6 Étude de la virulence des rhamnolipides produits par *B. thailandensis* à l'aide de *G. mellonella*

Les rhamnolipides sont considérés comme des facteurs de virulence (Zulianello *et al.*, 2006). Nous avons donc voulu vérifier l'effet de l'absence de production des rhamnolipides sur la virulence *in vivo* à l'aide du modèle d'infection alternatif *G. mellonella*. Afin de vérifier l'effet direct des rhamnolipides sur la virulence de *B. thailandensis*, les mutants *rhlA1-* et *rhlA2-* ainsi que le double mutant *rhlA1/rhlA2-* ont été testés. L'hypothèse initiale est que les mutants *rhlA-*, produisant moins de rhamnolipides, sont moins virulents que la souche sauvage.

À partir de cultures de 12h (3 ml NB + 4% glycérol), des dilutions de cultures ont été préparées (DO_{600} initiale=0.5) dans du milieu frais et placées à 37°C jusqu'à une DO_{600}=3.0. Par la suite, des dilutions 1/4000 ont été effectuées dans du $MgSO_4$ à 10 mM pour chacun des mutants ainsi que pour la souche sauvage. Un volume de 5 µl de cette dilution a été injecté par larve (n=8) de même pour un groupe contrôle qui est injecté avec du $MgSO_4$ à 10 mM. La mortalité est suivie jusqu'à ce qu'elle soit complète pour toutes les souches testées. De plus, afin de vérifier que la même quantité de bactéries a été injectée pour chacune des souches et donc s'assurer que les résultats ne sont pas biaisés, un décompte des « Unités Formatrices de Colonies » (UFC) a été effectué pour tous les inoculums.

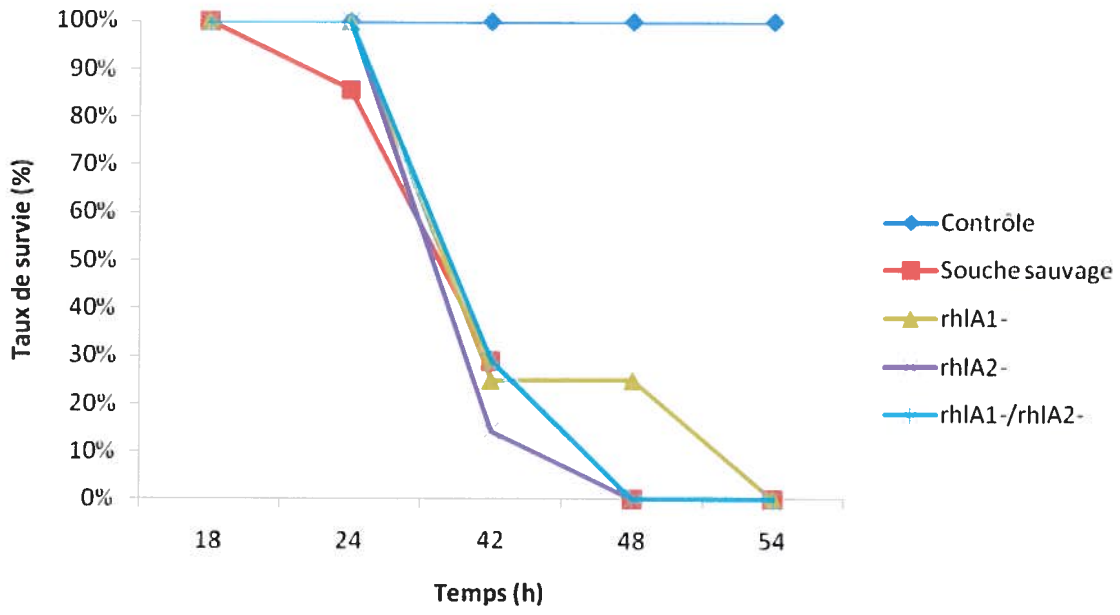


Figure 18. Suivi de la mortalité des *Galleria mellonella* suite à leur infection avec la souche sauvage de *B. thailandensis* ainsi que des différents mutants *rhlA*-.

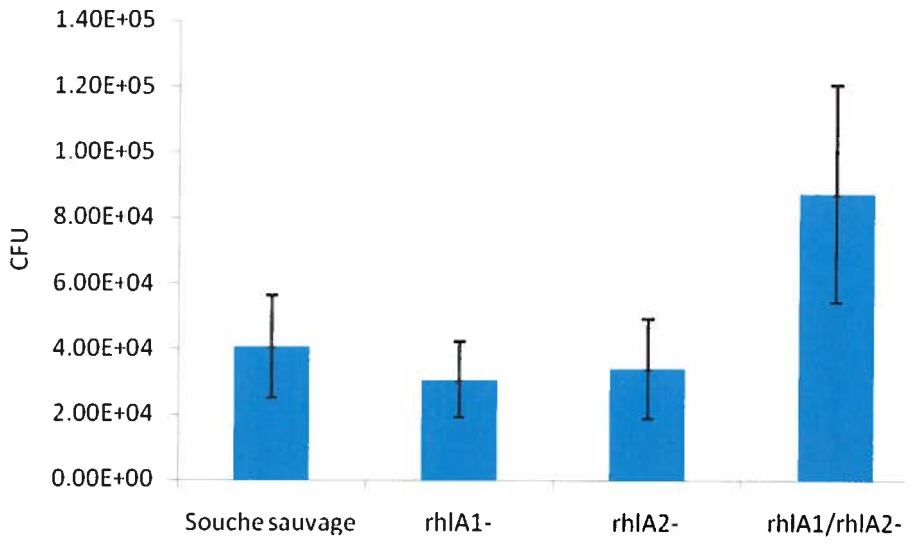


Figure 19. Décompte UFC pour chacun des inoculums initiaux injectés.

La figure 18 démontre que la virulence de toutes les souches testées est relativement semblable. Les groupes infectés ont une mortalité complète après 48h post-infection à l'exception du groupe infecté avec le mutant *rhlA1-* qui a pris 54h. Aucune mortalité n'a été observée chez le groupe contrôle. Si les rhamnolipides étaient impliqués dans la virulence de *B. thailandensis* et possédaient un effet important dans ce modèle d'infection, le double mutant, qui ne produit aucun rhamnolipide, devrait être moins virulent que les autres souches. Ce n'est pas le cas ici. Toutefois, la figure 19 démontre qu'il y a eu deux fois plus de bactéries du mutant *rhlA1/rhlA2-* injectées dans les larves que pour les autres souches testées bien que la DO de cette culture était équivalente a celle des autres. Il est donc possible que si la concentration de bactéries mutantes injectées lors de l'infection avait été pareille, ce mutant aurait été moins virulent que les autres souches. L'expérience a été répétée dans les mêmes conditions mais les résultats n'ont pas été concluants. Il aura été possible d'analyser et de quantifier la production de rhamnolipides *in vivo* afin de pouvoir ajouter un troisième axe à ces graphiques (voir la section 3.5 précédente pour la production de rhamnolipides *in vivo*).

3.7 Étude de l'effet des rhamnolipides issues de *P. aeruginosa* sur la bactérie *B. thailandensis*

En 2007, Tremblay *et al.* ont publié une étude portant sur l'effet chemoattracteur et chemorépulsif des HAAs, des monorhamnolipides et des dirhamnolipides sur le swarming de *P. aeruginosa*. Il a été rapporté que les dirhamnolipides attirent les cellules en swarming de *P. aeruginosa* tandis que les HAAs ont un effet répulsif sur ces dernières. Quant aux monorhamnolipides, ils semblent avoir un effet neutre sur le swarming et la formation de dendrites mais servent plutôt comme agents mouillants. Nous avons donc décidé d'étudier ce chimiotactisme en exposant des bactéries en swarming de *B. thailandensis* à des rhamnolipides à chaines courtes produits par *P. aeruginosa*. Cette expérience a été effectuée à l'aide des mutants *rhlA-* (contrôle négatif), *rhlB-* (HAAs seulement) et *rhlC-* (monorhamnolipides seulement) de *P. aeruginosa* PA14. Puisque ces mutants sont eux-mêmes capables d'effectuer

un minimum de swarming, un mutant *fli-* (PA14_50290), défectif dans la formation de flagelline de type B et donc incapable de swarming est aussi utilisé. Ce mutant produit toutefois des quantités des rhamnolipides équivalents à la souche sauvage.

Des pétris swarming (NB + 0.5% dextrose + 0.5% agar) ont été préparés et laissés à sécher pendant 30 minutes. Un volume de 5 µl d'une culture de *B. thailandensis* (DO_{600}=6.0) a été déposé à une extrémité de chaque pétri tandis qu'une striation des différents mutants *P. aeruginosa* est effectuée à l'autre extrémité. Les pétris sont placés à 30°C pendant la nuit. Le tout est effectué en triplicata. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 20.

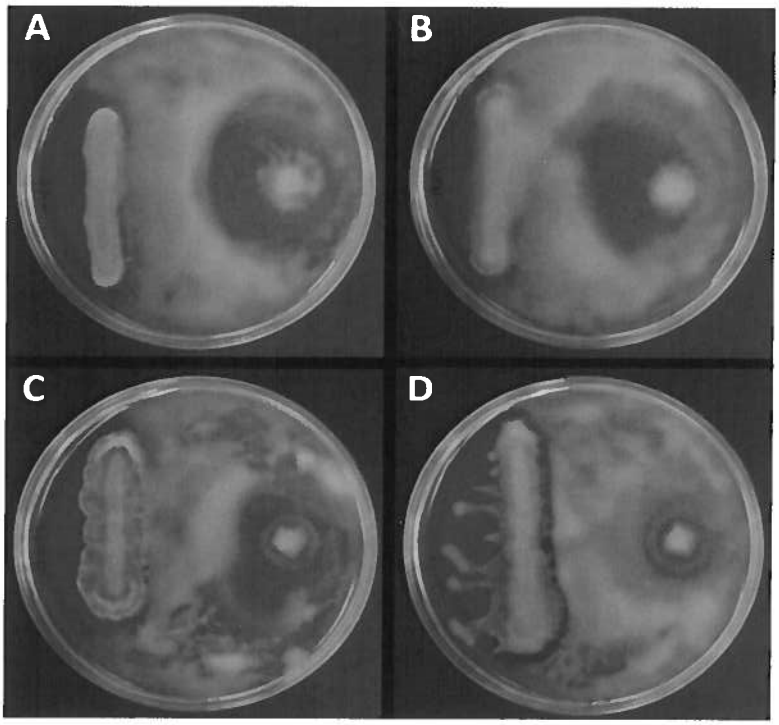


Figure 20. Effet des HAAs, monorhamnolipides et dirhamnolipides à chaine courte produits par *P. aeruginosa* sur des cellules en swarming de *B. thailandensis*. A) *P. aeruginosa fliC-* B) *P. aeruginosa rhlA-* C) *P. aeruginosa rhlB-* D) *P. aeruginosa rhlC-*. À gauche des pétris, *P. aeruginosa* et à droite, *B. thailandensis*

En premier lieu, on constate qu'en absence de la production endogène normale de rhamnolipides de *P. aeruginosa,* il n'y a aucun effet sur les cellules en swarming de *B. thailandensis*. Ces dernières se déplacent vers et fusionnent avec la trainée du mutant *rhlA*- (Figure 20b). Toutefois, il apparaît que les monorhamnolipides de *P. aeruginosa* ont un effet répulsif sur *B. thailandensis* (Figure 20d). Il est très visible que cette dernière évite le mutant *rhlC*- (qui ne produit que peu de HAAs et beaucoup de monorhamnolipides) puisqu'une espace « vide » est observé entre ces deux bactéries. Pour ce qui est de l'effet des HAAs seuls sur le swarming de *B. thailandensis* (Figure 20c), on constate que les cellules sont ralenties à l'approche de *P. aeruginosa* mais qu'elles ne l'évitent pas. Finalement, si on regarde le résultat obtenu avec le mutant *fliC*- (Figure 20a), il apparaît que les cellules de *B. thailandensis* sont encore une fois ralenties à l'approche de *P. aeruginosa* puisqu'il y a présence d'une zone vide entre les deux bactéries. La production de rhamnolipides n'étant pas affectée chez ce mutant, on peut supposer que ce sont les monorhamnolipides présents qui ont cet effet répulsif sur les cellules de *B. thailandensis*. Des essais avec des extraits purs de HAAs, de monorhamnolipides et de dirhamnolipides de *P. aeruginosa* sont envisagés. De plus, cette expérience pourrait être faite dans le sens contraire, c'est-à-dire l'effet des rhamnolipides à chaîne longue de *B. thailandensis* sur le swarming de *P. aeruginosa* et ainsi vérifier si on retrouve les mêmes effets répulsifs et attracteurs qu'avec les rhamnolipides endogènes. Toutefois, les différents mutants *rhl* de *B. thailandensis* ne sont pas encore créés.

3.8 Étude d'une co-culture de *P. aeruginosa rhlA*- et *rhlC*-

Aucune étude n'a été rapportée dans la littérature sur la capacité de *P. aeruginosa* d'utiliser des HAAs ou des monorhamnolipides, provenant du milieu extracellulaire pour la production endogène de mono- ou de dirhamnolipides. Cela revient à se demander si les HAAs ou les monorhamnolipides extracellulaires peuvent pénétrer à l'intérieur de la bactérie et si cette dernière peut s'en servir pour produire des nouvelles molécules de rhamnolipides? Cette hypothèse a été testée à l'aide des mutants *rhlA*- et *rhlC*- de *P. aeruginosa* PA14 puisque les

mutants respectifs chez *B. thailandensis* ne sont pas encore disponibles. Nous assumons que cette théorie est aussi valide pour *B. thailandensis*. Nous avons donc voulu vérifier si un mutant *rhlA*- (qui exprime théoriquement l'enzyme RhlC) peut utiliser les HAAs produits par un mutant *rhlC*- pour faire des rhamnolipides.

Pour ce faire, une co-culture de ces deux mutants a été effectuée en inoculant dans 25 ml de SW1/10F supplémenté avec 3% mannitol les deux mutants dans un rapport de 1 :1 (DO_{600} initial = 0.15 par culture). L'incubation a été effectuée dans un Erlenmeyer de 250 ml à 37°C avec agitation constante. Des Erlenmeyers contenant soit *rhlA*- ou bien *rhlC*- seul ont été utilisés comme témoins. L'expérience a été effectuée en triplicata. Un aliquot de 600 µl a été prélevé à tous les deux jours pendant 6 jours. Les quantités de rhamnolipides détectés à la fin de ce suivi sont présentées dans la figure 21.

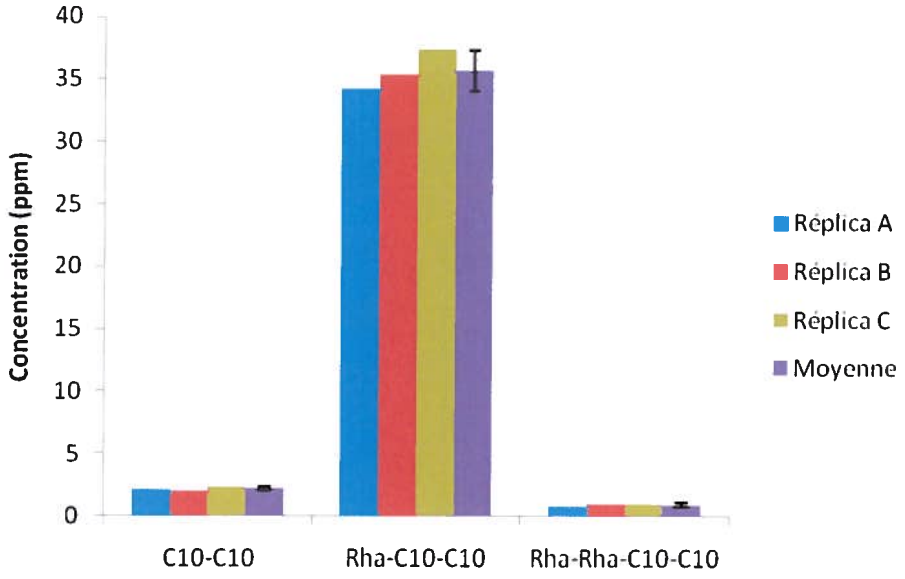


Figure 21. Production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{10}-C_{10}) d'un triplicata de co-cultures des mutants *rhlA*- et *rhlC*- de *P. aeruginosa* PA14 après 6 jours.

Il est à noter que le témoin *rhlA*- n'a produit aucun rhamnolipide après 6 jours de culture. Cette absence de rhamnolipides est normale puisque cette mutation inhibe la production des précurseurs de rhamnolipides. Pour l'autre contrôle *rhlC*-, des productions de HAAs de 2.4 ppm et de monorhamnolipides à 68.2 ppm sont observées après les 6 jours de cultures. Aucune trace de dirhamnolipide n'est détectée chez ce mutant, tel qu'attendu. La figure 21 montre une très bonne reproductibilité dans les concentrations des différents rhamnolipides observés. Contrairement aux groupes contrôles cependant, on voit une production faible (0.92 ppm) mais clairement mesurable de dirhamnolipides. Ce résultat, qui tendrait à confirmer l'hypothèse initiale, à l'effet que *P. aeruginosa* soit capable d'utiliser les monorhamnolipides exogènes pour la biosynthèse *de novo* endogène de dirhamnolipides. Cependant, vu la faible quantité de dirhamnolipides observée, on pourrait évoquer une autre hypothèse à l'effet que l'enzyme RhlC produite par le mutant *rhlA*- pourrait être présente dans le milieu extracellulaire suite à des lyses cellulaires et être responsable de cette transformation. Il est à noter ici que la présence de rhamnose activé (TDP-rhamnose) dans le milieu extracellulaire serait aussi nécessaire pour la production de dirhamnolipides.

3.9 Étude du lien QS et la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*

3.9.1 Implication du système HMAQ

Comme la découverte de rhamnolipides chez des espèces *Burkholderia* est relativement nouvelle, aucune étude n'a porté sur le contrôle génétique de la production de ces molécules chez ce genre bactérien. Nous avons donc voulu vérifier si le système HMAQ de *B. thailandensis* (Vial *et al.*, 2008), homologue du système PQS retrouvé chez *P. aeruginosa*, a un effet sur la production des rhamnolipides. Pour ce faire, les niveaux de production de rhamnolipides ont été suivis chez une souche de *B. thailandensis* mutée dans le gène *hmqA*. Cette mutation étant polaire, aucun 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinoline (HMAQ), n'est synthétisé chez ce mutant. Les cultures bactériennes ont été préparées dans 3 ml de milieu NB supplémenté avec 4% glycérol à partir d'inoculum frais (O/N, 3 ml NB + 4% glycérol, 37°C, agitation) du mutant *hmqA*-

et de la souche sauvage de *B thailandensis* E264 (DO_{600} initiale =0.5), comme contrôle. Le tout a été effectué en triplicata et placé sous agitation constante à 37°C. Après 48h, un aliquot de 600 µl a été prélevé pour chacune des cultures et les surnageants ont été analysés par CL/SM pour mesurer la production de rhamnolipides (Figure 22).

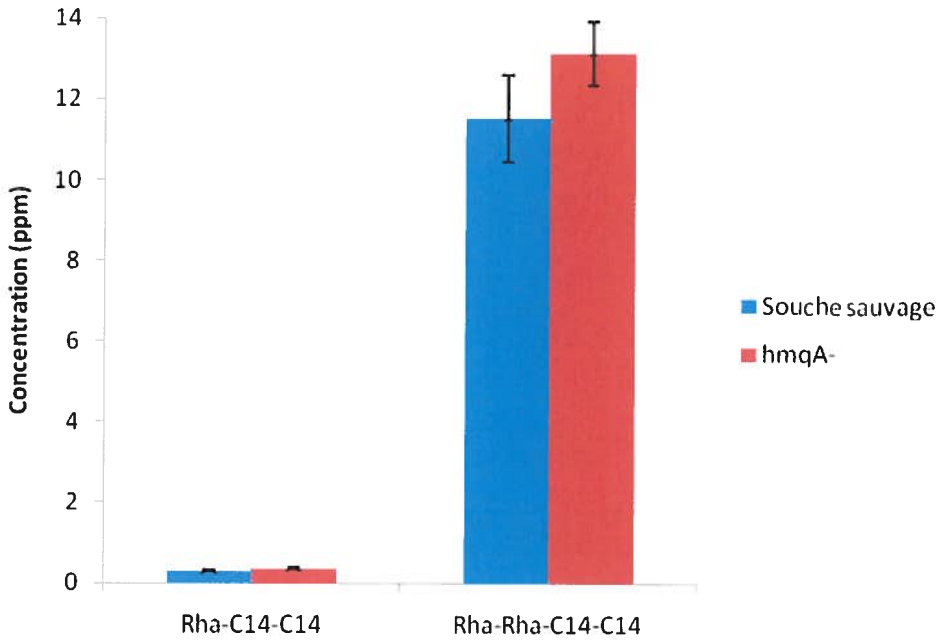


Figure 22. Production des principaux rhamnolipides (congénères en C_{14}-C_{14}) d'un triplicata de cultures de la souche sauvage de *B. thailandensis* E264 et de son mutant *hmqA*-.

La figure 22 montre des valeurs moyennes de Rha-C_{14}-C_{14} de 0.30 et 0.37 ppm pour la souche sauvage et le mutant *hmqA*-, respectivement. Pour le Rha-Rha-C_{14}-C_{14}, ces valeurs sont de 11.54 et 13.15 ppm, respectivement. Des quantités de HAAs en C_{14}-C_{14} inférieures à 0.03 ppm ont été détectées dans les deux séries d'échantillons (résultats non présentés). Tous ces résultats nous indiquent que le système HMAQ de *B. thailandensis* n'a aucun effet sur la production de rhamnolipides chez cette souche. Cette expérience a été répétée à deux reprises afin de confirmer ces résultats.

3.9.2 Effet de la production de rhamnolipides sur les quantités de HMAQs

Lors de la soumission initiale de l'article scientifique, un réviseur a demandé si les HMAQs sont présents en plus grande quantité chez un mutant *rhlA1/rhlA2-*. Ce réviseur s'est basé sur un article antérieur démontrant que, chez *P. aeruginosa*, les rhamnolipides et les HAQs sont issus, au moins en partie, d'un pool commun d'acides β-hydroxy(do)décanoïques dans leur voie de biosynthèse (Bredenbruch *et al.*, 2005). Comme quelques espèces de *Burkholderia* produisent des HMAQs (Vial *et al.*, 2008) qui sont des homologues des HAQs, il était intéressant de vérifier si la production des HMAQs est favorisée lors d'un déficit ou d'une absence complète de production de rhamnolipides. Afin de répondre à ceci, la souche sauvage de *B. thailandensis* ainsi que ces différents mutants *rhlA-* ont donc été testés pour leur production des HMAQs majoritaires. Des cultures de 12h (3 ml de NB + 4% glycérol, 37°C, agitation) ayant des DO_{600}= 8.5-9.0 ont été analysées au CL/SM. L'expérience n'a été effectuée qu'en unicata seulement.

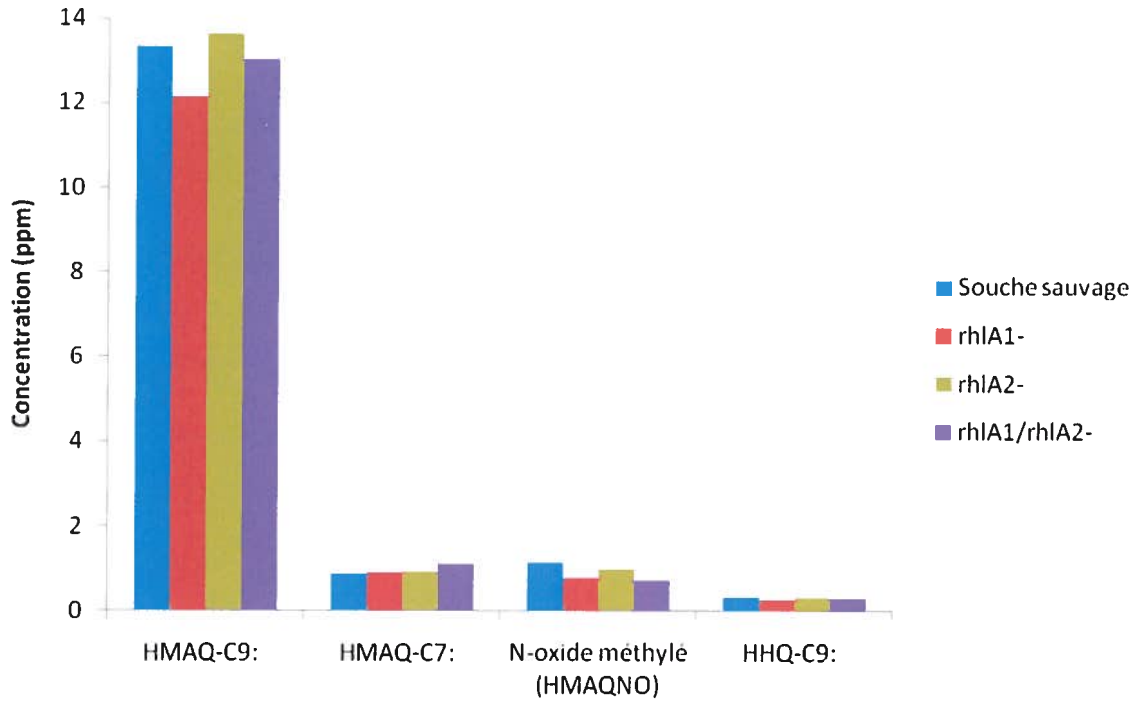


Figure 23. Concentrations des principaux HMAQs produits par la souche sauvage de *B. thailandensis* et ses mutants *rhlA*.

La figure 23 montre qu'un décifit ou une absence totale de production de rhamnolipides n'affecte aucunement la production de HMAQs chez *B. thailandensis*. De plus, un article récent corrobore ces résultats puisqu'il démontre que l'enzyme RhlG qui était initialement supposée responsable de la synthèse d'un précurseur commun aux HAQ et au rhamnolipides (Bredenbruch *et al.*, 2005) n'est pas finalement impliqué dans la biosynthèse des rhamnolipides. (Zhu et Rock, 2008).

3.9.3 Implication des systèmes *btaR/btaI*

Tel que mentionné dans la revue de littérature de la présente dissertation (section 1.4.5 : Le QS chez *B. pseudomallei, B. mallei* et *B. thailandensis*), les systèmes BtaR/BtaI (*btaR1/btaI1, btaR2/btaI2* et *btaR3/btaI3*), homologues au système LuxR/LuxI, sont à la base du QS chez *B. thailandensis*. Les principales HSL produites par chacun de ces systèmes sont décrits dans la figure 3. L'équipe du Dr. Greenberg nous a gracieusement fait parvenir plusieurs mutants de ces systèmes; soit deux mutants simples dans les synthases des HSL respectifs de ces systèmes, tel *btaI2-* et *btaI1,3-*, et un mutant multiple dans les trois synthases, *btaI1,2,3-*. De plus, nous avons reçu un mutant du régulateur transcriptionnel *btaR2*. Nous avons donc pu étudier la production des HMAQs chez ces mutants. Des cultures bactériennes ont été effectuées à partir d'inoculum frais (O/N, 3 ml NB + 4% glycérol, 37°C, agitation) à une DO_{600}=0.25. Ces cultures ont été analysées par CL/SM après 16h (DO_{600}=8.5-9.0). Le tout a été effectué en triplicata.

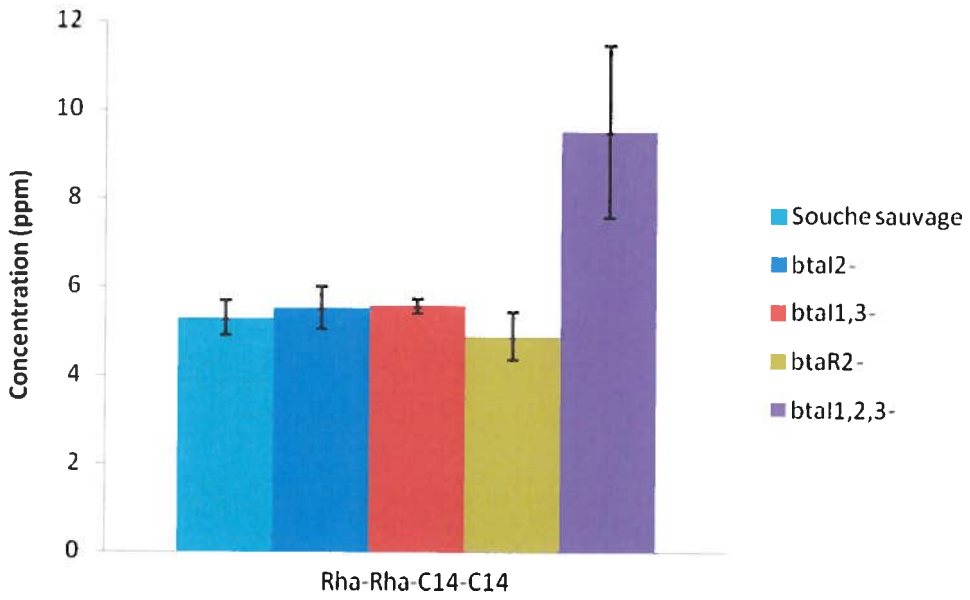


Figure 24. Concentration du Rha-Rha-C_{14}-C_{14} dans des cultures de la souche sauvage de *B. thailandensis* ainsi que dans divers mutants des systèmes BtaR/BtaI.

Compte tenu que les quantités de C_{14}-C_{14} et de Rha-C_{14}-C_{14} détectées dans ces souches sont très minimes, seulement les résultats de Rha-Rha-C_{14}-C_{14} sont présentés dans la figure 24. On constate que les quantités de Rha-Rha-C_{14}-C_{14} sont relativement semblables pour la souche sauvage ainsi que les mutants *btaI2-*, *btaI1,3-* et *btaR2-*, indiquant que ces trois systèmes ne sont pas impliqués dans la régulation de la production de rhamnolipides. Cependant, dans le cas du triple mutant, *btaI1,2,3-*, il y deux fois plus de production de Rha-Rha-C_{14}-C_{14} que dans la souche sauvage et ce résultat est significatif comme l'indiquent les barres d'erreur. On pourrait donc émettre l'hypothèse qu'en absence des HSL (Chandler *et al.*, 2009), normalement produites par les trois systèmes BtaR/BtaI chez *B. thailandensis*, la production des rhamnolipides est favorisée. Il est donc possible que les HSL agissent sur un répresseur de la biosynthèse des rhamnolipides. Toutefois, les HSL pourraient n'agir sur la production de rhamnolipides qu'indirectement par un effet indirect sur un autre système de régulation.

Chapitre IV - Discussion de l'ensemble des résultats

4.1 Présence d'orthologues *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* chez les membres de *Burkholderia*

Des gènes orthologues aux gènes de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, soit *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*, ont été retrouvés chez plusieurs membres du genre bactérien *Burkholderia*. Les bactéries *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. mallei*, *B. ambifaria* et *B. cenocepacia* possèdent ces trois gènes sur leur deuxième chromosome dans un regroupement de gènes, probablement des opérons. Chez *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* et *B. mallei*, deux copies identiques à 100% sont présentes sur ce deuxième chromosome. Ce regroupement de gènes est très conservé entre ces espèces. En plus des gènes *rhl*, des gènes associés à des transporteurs sont aussi présents, servant potentiellement à l'efflux des rhamnolipides (Tableau 5). La conservation de ce regroupement de gènes entre ces espèces est probablement attribuable à une sélection génétique positive au cours de leur évolution. Il est possible que la production de rhamnolipides chez ces espèces soit suffisamment bénéfique pour qu'une telle sélection l'ait conservée. De plus, comme mentionné dans l'article scientifique, la conservation des deux copies identiques de ce regroupement de gènes chez les espèces en question est probablement due aux bénéfices immédiats qu'elles apportent à leur hôte. Une telle duplication n'est normalement pas conservée à moins qu'elle représente un avantage pour la bactérie (Zhang, 2003; Reams et Neidle, 2004).

Quant à *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*, qui possèdent seulement une copie du regroupement de gènes *rhl*, il est possible que la présence d'un petit gène additionnel conservé soit la raison pour laquelle aucun rhamnolipide ne soit détecté chez ces espèces (Figure 16). Ce gène a une fonction prédite d'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase putative, une modification post-traductionnelle (http://www.burkholderia.com). Dans la littérature, on ne retrouve que quelques études qui portent sur cette protéine membranaire chez les eucaryotes. Chez ces organismes, les protéines terminant avec un motif « CaaX » (C étant une cystéine; A un acide aminé aliphatique; X un de nombreux acides aminés) subissent une série de modifications post-traductionnelles incluant une isoprénylation, un clivage en C-terminale des trois derniers acides aminés et finalement une méthylation carboxylique. Localisée dans le

réticulum endoplasmique, l'isoprénylcystéine carboxyle méthyltransférase ou ICMT, est responsable de cette dernière modification. Elle fut découverte pour la première fois chez la levure comme le produit du gène *ste14* (Romano et Michaelis, 2001; Anderson *et al.*, 2005). Toutefois, l'homologue procaryote n'a pas été rapporté dans la littérature. Il est possible que la biosynthèse du biosurfactant en question soit arrêtée par la transcription de cette méthyltransférase putative ou bien que le rhamnolipide soit sous une forme méthylée. Toutefois, lors d'analyses par CL/SM d'échantillons provenant de *B. ambifaria* et *B. cenocepacia*, les ions pseudomoléculaires correspondant à des rhamnolipides méthylés ont été cherchés sans succès. Des rhamnolipides méthylés ont été rapportés pour la première fois en 1982 chez *P. aeruginosa*, mais aucune autre publication n'a porté sur ce sujet depuis (Hirayama et Kato, 1982). Il demeure cependant possible que des rhamnolipides méthylés sur leur fonction acide ne soient que mal ionisés dans des conditions d'électronébulisation négative utilisées normalement pour la détection des rhamnolipides et qu'ils aient pu ainsi échapper à leur détection. Une autre explication pour une motilité swarming positive mais une absence de rhamnolipides détectables par CL/SM est que la production de ces molécules chez ces souches soit absente due à la méthylation putative mentionnée ci-haut, mais qu'un autre type de biosurfactant soit produit. Comme mentionné dans la revue de littérature, un glycolipide a été identifié chez une souche de *B. cenocepacia* possédant une masse moléculaire de 550.4 g/mol mais n'a été que partiellement purifié (Wattanaphon *et al.*, 2008). La caractérisation structurelle de ce biosurfactant n'a pas encore été effectuée et donc il est difficile de pouvoir imaginer la structure d'une telle molécule tensioactive produite par *B. cenocepacia*. Aucun pic résultant des nombreuses analyses CL/MS des cultures de *B. cenocepacia* et *B. ambifaria* n'a indiqué la présence d'une molécule dominante de cette sorte.

4.2 Production de rhamnolipides chez *B. thailandensis* – Biosynthèse, régulation et caractérisation de ces rhamnolipides

Nous avons détecté pour la première fois la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Cette bactérie possède deux copies identiques des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* sur son deuxième chromosome et ce, probablement en opéron. Nous avons démontré, à l'aide de mutations dans chacun des deux gènes *rhlA*, que ces deux regroupements de gènes sont fonctionnels et contribuent à la production totale de rhamnolipides chez cette bactérie. Nos résultats suggèrent que ces deux regroupements de gènes sont régulés différemment, potentiellement par deux promoteurs distincts. Cette hypothèse est aussi appuyée par le fait qu'un des regroupements produits près de deux fois plus de rhamnolipides que l'autre (Figure 13). De plus, à l'aide d'un mutant *hmqA*- qui, basé sur l'analogie avec le système des HAQs chez *P. aeruginosa*, devrait théoriquement inactiver le système de QS basé sur les HMAQs chez *B. thailandensis*, nous avons déterminé que ce dernier système n'est pas impliqué dans la régulation de la biosynthèse de rhamnolipides. Toutefois, les systèmes BtaR/BtaI semblent agir sur un répresseur dans cette régulation. Selon nos résultats, un triple mutant des synthases de ce système, *btaI1,2,3*-, produit deux fois plus de rhamnolipides que la souche sauvage (Figure 24). Pris ensemble, ces résultats laissent croire qu'en absence de HSL, un répresseur n'est pas activé et la transcription de rhamnolipides est favorisée.

Lors d'essais de swarming avec les mutants *rhlA*- chez *B. thailandensis*, nos résultats ont démontré que la fonctionnalité d'un seul des regroupements de gènes n'est pas suffisante pour permettre ce genre de motilité. Par la suite, nous avons déterminé qu'un seuil de rhamnolipides est nécessaire pour vaincre l'hydrophobicité présent au contour de la colonie. Des essais de restauration de phénotype swarming chez ces mutants par l'ajout de rhamnolipides exogènes ont appuyé cette théorie (Figure 14).

Étant donné la longueur inhabituelle des chaînes aliphatiques composant les rhamnolipides issus de *B. thailandensis* par rapport à ceux de *P. aeruginosa*, nous avons

investigué leur potentiel à former des micelles. Nous avons déterminé que la CMC associée à ces molécules est beaucoup plus petite que celle des rhamnolipides à chaînes plus courtes de *P. aeruginosa*; c'est-à-dire 225 mg/L versus 600 mg/L, respectivement (Figure 12). L'hydrophobicité accrue des rhamnolipides à chaînes longues, due aux groupements alkyles additionnels, facilite la formation de micelles (Zhang *et al.*, 2004). Cette propriété est intéressante dans un contexte d'utilisation industrielle des rhamnolipides.

4.3 Efflux des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* et les espèces *Burkholderia*

La présence d'un gène ayant une fonction prédite de transporteur, situé en *amont* du gène *rhlC* chez *P. aeruginosa*, laissait soupçonner son implication probable dans l'efflux des rhamnolipides. De plus, ces deux gènes forment un opéron et sont sous le contrôle d'un même promoteur de type σ^{54}, le tout étant sous la régulation du système Rhl (Rahim *et al.*, 2001). Chez les espèces de *Burkholderia* possédant les gènes de biosynthèse de rhamnolipides, il y a présence de trois gènes eux aussi vraisemblablement impliqués dans le transport de ces molécules (voir Tableau 5 pour fonctions de ces gènes chez *B. thailandensis* et *B. pseudomallei*). De plus, ces trois gènes sont conservés entre les espèces en question et sont contenus dans ce qui semble être un opéron pour la production et l'efflux de rhamnolipides. Ceci fortifie donc l'hypothèse initiale à l'effet que, dans ces deux genres, des gènes de transport des rhamnolipides soient exprimés en même temps que certains de leurs gènes de biosynthèse.

Toutefois, lors des expériences utilisant un mutant du gène PA14_49750 provenant de la banque de mutants de Liberati et son équipe, la présence de dirhamnolipides dans nos cultures nous a indiqué une possible contamination chez ce mutant (Liberati *et al.*, 2006). La mutation engendrée étant normalement polaire chez tous les mutants de cette banque, aucun rhamnolipide n'aurait du être produit puisque *rhlC* est situé directement en *aval* du site de mutation. À cause de cette production, il est impossible de tirer des conclusions de ces résultats

pour le moment. La mutation devra être confirmée et l'expérience refaite à la suite de cette confirmation.

4.4 Les rhamnolipides en tant que facteurs de virulence

Les rhamnolipides étant connus comme facteurs de virulence, cette propriété a été vérifiée à l'aide du modèle d'infection alternatif *G. mellonella*. Les différents mutants *rhlA-* de *B. thailandensis* créés au cours de ce projet ont été testés chez ce modèle. Théoriquement, le double mutant *rhlA1/rhlA2-*, incapable de produire des rhamnolipides, aurait du être moins virulent que la souche sauvage. Il a cependant été observé que les mutants *rhlA1-*, *rhlA2-* et *rhlA1/rhlA2-* provoquaient une mortalité semblable à celle de la souche sauvage de *B. thailandensis,* dans ce modèle d'infection (Figure 18). Il semble donc que les rhamnolipides ne jouent qu'un rôle minime dans la virulence chez *G. mellonella*. Il faut cependant noter que les concentrations de bactéries ne sont pas toujours corrélées avec la DO des cultures, et que cela a entrainé une augmentation de la quantité attendue de bactéries injectées chez le double mutant, ce qui a pu fausser les résultats (Figure 19). Il est également possible que des résultats différents soient obtenus avec un modèle d'infection autre comme *Drosophila melanogaster* (Apidianakis et Rahme, 2009).

4.5 Utilisation de rhamnolipides exogènes pour la production *de novo* endogène

Il est bien connu que les rhamnolipides sont des produits tensio-actifs sécrétés hors des bactéries. Toutefois, nous avons voulu étudier le potentiel des monorhamnolipides d'être réabsorbés dans la cellule pour la production *de novo* de dirhamnolipides. Des essais à l'aide de co-cultures pour l'échange de monorhamnolipides entre différents mutants ont été effectués. Toutefois, les résultats restent ambigus et une méthode plus développée reste à être testée

afin de confirmer ou pas le potentiel des HAAs et/ou des rhamnolipides à diffuser à l'intérieur de la cellule. Une telle technique est proposée dans les perspectives du projet.

Chapitre V - Conclusions et perspectives

Au cours de ce projet, l'étude de la production de rhamnolipides a été effectuée chez plusieurs membres du genre bactérien *Burkholderia*. Dans ces études, la capacité *B. thailandensis* de produire des congénères très variés de rhamnolipides a été démontrée pour la première fois. De plus, un seul congénère rhamnolipidique, le Rha-Rha-C_{14}-C_{14} avait été identifié chez *B. pseudomallei*, et ce travail a permis d'identifier plusieurs autres congénères. Ces bactéries produisent des rhamnolipides dont les chaînes aliphatiques sont plus longues que celles observées chez *P. aeruginosa*. Nous avons démontré à l'aide de *B. thailandensis* que cette caractéristique se traduit par une CMC plus intéressante du point de vue d'applications industrielles et commerciales potentielles.

Au niveau génétique, nous avons aussi identifié deux copies identiques d'un regroupement de gènes contenant les gènes nécessaires à la biosynthèse des rhamnolipides, soit *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*, et ce chez les souches *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei*. Nous avons démontré chez *B. thailandensis* que ces deux copies sont fonctionnelles et contribuent à la production de rhamnolipides. De plus, nous avons prouvé que les rhamnolipides sont nécessaire au swarming de cette dernière et qu'il y a une concentration seuil pour permettre cette motilité.

Comme suite à ces travaux, il serait très intéressant de pouvoir élucider les véritables promoteurs de chacune des copies du regroupement de gènes *rhl* chez *B. thailandensis* et de connaître leur régulation. Éventuellement, il serait aussi intéressant de vérifier la fonctionnalité des copies *rhl* chez *B. pseudomallei* lorsqu'une installation de niveau 3 sera disponible pour la manipulation de ce pathogène. Il serait utile d'effectuer des mutations dans d'autres gènes tels *rhlB* et *rhlC* et de vérifier les effets découlant de celles-ci. De plus, lorsque des techniques de création de mutants non-polaires seront optimisées chez le genre bactérien *Burkholderia*, il serait possible d'en prendre avantage pour nos manipulations génétiques. À ce point et à l'aide de ces mutants, une étude plus profonde de l'implication des systèmes QS dans la régulation de la biosynthèse de rhamnolipides chez ces espèces serait envisageable.

Quant à l'étude de la virulence de ces rhamnolipides, il serait intéressant de vérifier ceci à l'aide d'un modèle d'infection alternatif autre que *G. mellonella* afin de pouvoir confirmer nos

résultats. Nos résultats initiaux ont indiqué que les rhamnolipides ne semblent pas impliqués dans la virulence de *B. thailandensis* chez ce modèle d'infection. Toutefois, il serait intéressant de vérifier ces résultats chez la mouche *D. melanogaster*.

Au moment où il sera possible d'effectuer des mutations non-polaires chez *B. thailandensis*, il serait aussi envisageable de vérifier l'implication réelle des trois gènes associés à des types de transporteurs qui sont présents dans les regroupements de gènes *rhl*. On pourrait ainsi déterminer s'ils servent à l'efflux des rhamnolipides ou pas. Dans la même voie, la réalisation d'un nouveau mutant du gène *PA14_49750* chez *P. aeruginosa* pourrait confirmer que ce dernier n'est pas impliqué dans cet efflux, au cas où le mutant testé provenant de la banque de transposons (Liberati *et al.*, 2006) soit contaminé.

Finalement, vu qu'aucune production de rhamnolipides n'a été détectée chez *B. mallei*, il serait aussi d'intérêt de vérifier si cette dernière est capable d'effectuer le swarming. Si oui, cela serait une bonne indication qu'il y a production d'un biosurfactant et que les conditions de culture testées auparavant n'étaient pas optimisées pour leur biosynthèse. Quant à la production de rhamnolipides chez *B. cenocepacia* et *B. ambifaria*, il sera intéressant d'effectuer une technique de PCR quantitative pour leurs gènes respectifs *rhlA, rhlB* et *rhlC* afin de vérifier leur expression réelle. Les résultats d'une telle expérience confirmerait ou pas la transcription de ces gènes et permettrait de corréler, ou pas, avec l'absence de rhamnolipides détectables.

Pour les expériences portant sur l'utilisation de rhamnolipides exogènes pour la production *de novo* endogène, nous proposons les expériences décrites ci-après. Pour démontrer la possibilité que des RhlC actives libres dans le milieu, suite à une lyse cellulaire partielle, soient capables de transformer des monorhamnolipides extracellulaires en dirhamnolipides, l'expérience suivante est suggérée. Une culture de *P. aeruginosa rhlA-* mature serait soumise à une ultrasonification afin de briser les membranes cellulaires de bactéries et ainsi libérer le contenu cellulaire, dont les enzymes RhlC. À la suite d'une centrifugation pour enlever les débris cellulaires, ce surnageant serait donné à une culture de *P. aeruginosa rhlC-* mature. Ce mutant étant capable de produire des monorhamnolipides de façon normale sans cependant pouvoir les convertir en dirhamnolipides à cause d'un gène *rhlC* muté, la production

de dirhamnolipides dans le milieu extracellulaire suite à l'ajout de RhlC actives dans le milieu confirmerait que l'enzyme RhlC extracellulaire pourrait produire des dirhamnolipides dans cette situation. Dans le cas où la production de dirhamnolipides serait absente lors de cette expérience, ceci confirmerait que la production de dirhamnolipides observée lors des essais présentés dans ce projet est véritablement associée au fait que les monorhamnolipides peuvent pénétrer dans la cellule pour une production *de novo* et non à la seule possibilité d'une synthèse exogène par des RhlC libres dans le milieu extracellulaire.

En deuxième lieu, il est possible d'effectuer un marquage au C^{13} des dilipides de *P. aeruginosa* à l'aide d'un mutant *rhlB-*, pour ensuite donner ces molécules marquées à un mutant non polaire *rhlA-*. La production de mono- et/ou de di-rhamnolipides marqués indiquerait que la bactérie est capable d'incorporer des dilipides exogènes pour la biosynthèse de rhamnolipides. Comme *P. aeruginosa* produit des rhamnolipides à chaînes courtes majoritairement composés de congénères en C_{10}-C_{10}, il serait possible de vérifier si *B. thailandensis* peut aussi synthétiser des rhamnolipides ayant cette même longueur de chaîne lorsque mise en présence de dilipide C_{10}-C_{10}. Ces deux expériences sont aussi possibles en situation contraire avec la création d'un mutant *rhlB-* chez *B. thailandensis*. De la même façon, il serait possible de vérifier si *P. aeruginosa* est capable de synthétiser des congénères en C_{14}-C_{14} si on la met en présence de ce dilipide purifié de *B. thailandensis*. Ce congénère est normalement absent chez *P. aeruginosa*. Une telle production indiquerait que l'incorporation de dilipides exogènes est possible.

Annexe 1 - Milieux de cultures

AB Minimal

AB 20X sels		Tampon 20X AB	
NH_4Cl	20 g	$K_2HPO_4*3H_2O$	78.6 g
$MgSO_4*7H_2O$	6 g	$NaH_2PO_4*H_2O$	23 g
KCl	3 g		
$CaCl_2*H_2O$	0.26 g		
$FeSO_4*7H_2O$	0.05 g		

- Compléter avec 1L H_2O, respectivement
- Autoclaver

Composition finale

- Source de carbone (ex : dextrose) 0.5%
- AB 20X sels 1X
- Tampon 20X AB 1X
- Ajouter source de citrate 10 mM

Pour essais en milieu solide :

- Ajouter 0.1% Casamino acids (Fisher)
- Ajouter 0.4% Bacto-agar

Milieu Sputum Artificiel

- Mucine	3 g	
- ADN	2 g	
- Tryptophane	2.85 g	
- Jaune d'œuf	25 ml	(émulsifiant)
- DTPA	0.00275 g	(chélateur)
- NaCl	2.5 g	
- KCl	1.1 g	
- $CaCl_2*2H_2O$	4.6 ml	(sol. mère à 1 M)
- $NaNO_3$	1.2 ml	(sol. mère à 5 M)
- $FeCl_2$	500 µl	(sol. mère à 1 mM)

- Compléter avec 500 ml H_2O
- Ajuster le pH à 7.0 avec du Tris
- Aliquoter en 40 ml dans des Falcons
- Stériliser aux UV
- Entreposer à -80°C

Milieu Siegmund-Wagner (SW)

- KH_2PO_4 0.7
- Na_2HPO_4 0.9
- $NaNO_3$ 2.0
- $MgSO_4*7H_2O$ 0.4
- $CaCl_2*2H_2O$ 0.1
- Source de carbone (ex: glycérol) 20

Pour SW1/10F, ajouter :

- $FeSO_4*7H_2O$ 0.001

➢ Compléter avec 1L H_2O
➢ Autoclaver

Références

ALEXEYEV, M. F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. Biotechniques **26**(5): 824-826, 828.

ANDERSON, J. L. , B. S. HENRIKSEN , R. A. GIBBS et C. A. HRYCYNA. 2005. The Isoprenoid Substrate Specificity of Isoprenylcysteine Carboxylmethyltransferase: DEVELOPMENT OF NOVEL INHIBITORS. J Biol Chem **280**(33): 29454-29461.

ANDRÄ, J. , J. RADEMANN , J. HOWE , M. H. KOCH , H. HEINE , U. ZÄHRINGER et K. BRANDENBURG. 2006. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. Biol Chem **387**(3): 301-310.

APERIS, G. , B. B. FUCHS , C. A. ANDERSON , J. E. WARNER , S. B. CALDERWOOD et E. MYLONAKIS. 2007. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. Microbes and Infection **9**(6): 729-734.

APIDIANAKIS, Y. et L. G. RAHME. 2009. *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. Nat Protocols **4**(9): 1285-1294.

ARIMA, K. , A. KAKINUMA et G. TAMURA. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun **31**(3): 488-494.

BECHER, P. 1965. Emulsions, Theory and Practice. New York, Reinhold Publishing.

BERGSTRÖM, S. , H. THEORELL et H. DAVIDE. 1946. On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. Ark Kem Mineral Geol **23A**: 1-12.

BOGNOLO, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **152**(1-2): 41-52.

BORDOLOIA, N. K. et B. K. KONWAR. 2009. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. Journal of Hazardous Materials **170**(1): 495-505.

BOUCHEZ-NAÏTALI, M. , H. RAKATOZAFY , R. MARCHAL , J. Y. LEVEAU et J. P. VANDECASTEELE. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. Journal of Applied Microbiology **86**(3): 421-428.

BOUCHEZ-NAÏTALI, M. et J.-P. VANDECASTEELE. 2008. Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**(9): 1901-1907.

BREDENBRUCH, F. , M. NIMTZ , V. WRAY , M. MORR , R. MULLER et S. HAUSSLER. 2005. Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines. J Bacteriol **187**(11): 3630-3635.

BRETT, P. J. , D. DESHAZER et D. E. WOODS. 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. Int J Syst Bacteriol **48 Pt 1**: 317-320.

BROUQUI, P. , M. C. ROUSSEAU , A. STEIN , M. DRANCOURT et D. RAOULT. 1995. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa*-infected orthopedic prostheses with ceftazidime-ciprofloxacin antibiotic combination. Antimicrob Agents Chemother **39**(11): 2423-2425.

BURGER, M. M. , L. GLASER et R. M. BURTON. 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem **238**: 2595-2601.

BURKHOLDER, W. H. 1948. Bacteria as Plant Pathogens. Annual Review of Microbiology **2**(1): 389-412.

BURKHOLDER, W. H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology **64**: 468-475.

CAIAZZA, N. C. , R. M. Q. SHANKS et G. A. O'TOOLE. 2005. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **187**(21): 7351-7361.

CAMEOTRA, S. et R. MAKKAR. 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules Current Opinion in Microbiology **7**(3): 262-266.

CHADWICK, J. S. 1967. Serological responses of insects. Fed Proc **26**: 1675-1679.

CHAMPION, O. L. , I. A. M. COOPER , S. L. JAMES , D. FORD , A. KARLYSHEV , B. W. WREN , M. DUFFIELD , P. C. F. OYSTON et R. W. TITBALL. 2009. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiology **155**(5): 1516-1522.

CHANDLER, J. R. , B. A. DUERKOP , A. HINZ , T. E. WEST , J. P. HERMAN , M. E. A. CHURCHILL , S. J. SKERRETT et E. P. GREENBERG. 2009. A mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. J Bacteriol **191**(19): 5901-5909.

CHENG, A. C. et B. J. CURRIE. 2005. Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. Clin Microbiol Rev **18**(2): 383-416.

CHIARINI, L. , A. BEVIVINO , C. DALMASTRI , S. TABACCHIONI et P. VISCA. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. Trends in Microbiology **14**(6): 277-286.

CHOI, K. H. , J. B. GAYNOR , K. G. WHITE , C. LOPEZ , C. M. BOSIO , R. R. KARKHOFF-SCHWEIZER et H. P. SCHWEIZER. 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. Nat Methods **2**(6): 443-448.

CHOI, K. H. , T. MIMA , Y. CASART , D. RHOLL , A. KUMAR , I. R. BEACHAM et H. P. SCHWEIZER. 2008. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. Appl Environ Microbiol **74**(4): 1064-1075.

COENYE, T. et P. VANDAMME. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiology **5**(9): 719-729.

COENYE, T. , P. VANDAMME , J. R. W. GOVAN et J. J. LIPUMA. 2001. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. J Clin Microbiol **39**(10): 3427-3436.

CONWAY, B.-A. et E. P. GREENBERG. 2002. Quorum-Sensing Signals and Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia vietnamiensis*. J Bacteriol **184**(4): 1187-1191.

DANCE, D. A. B. 2000. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human-animal hosts. Acta Tropica **74**(2-3): 159-168.

DARLING, P. , M. CHAN , A. D. COX et P. A. SOKOL. 1998. Siderophore Production by Cystic Fibrosis Isolates of *Burkholderia cepacia*. Infect Immun **66**(2): 874-877.

DAVEY, M. E. , N. C. CAIAZZA et G. A. O'TOOLE. 2003. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol **185**(3): 1027-1036.

DEKIMPE, V. et E. DÉZIEL. 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. Microbiology **155**: 712-723.

DESHAZER, D. , P. J. BRETT , R. CARLYON et D. E. WOODS. 1997. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. J Bacteriol **179**(7): 2116-2125.

DESHAZER, D. , D. M. WAAG , D. L. FRITZ et D. E. WOODS. 2001. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. Microb Pathog **30**: 253-269.

DÉZIEL, E. , F. LÉPINE , D. DENNIE , D. BOISMENU , O. A. MAMER et R. VILLEMUR. 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. , F. LÉPINE , S. MILOT , J. HE , M. N. MINDRINOS , R. G. TOMPKINS et L. G. RAHME. 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1339-1344.

DÉZIEL, E. , F. LÉPINE , S. MILOT et R. VILLEMUR. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochim Biophys Acta **1485**(2-3): 145-152.

DÉZIEL, E. , F. LÉPINE , S. MILOT et R. VILLEMUR. 2003. *rhlA* 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 **149**(Pt 8): 2005-2013.

DÉZIEL, E. , G. PAQUETTE , R. VILLEMUR , F. LÉPINE et J. BISAILLON. 1996. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Appl Environ Microbiol **62**(6): 1908-1912.

DONG, Y.-H. , X.-F. ZHANG , S.-W. AN , J.-L. XU et L.-H. ZHANG. 2008. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependant biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. Communicative & Integrative Biology **1**(1): 88-96.

DU NOÜY, P. L. 1922. Spontaneous Decrease Of The Surface Tension Of Serum. I. . J Exp Med **xxxw**: 575-597.

DUERKOP, B. A. , J. P. HERMAN , R. L. ULRICH , M. E. CHURCHILL et E. P. GREENBERG. 2008. The *Burkholderia mallei* BmaR3-BmaI3 quorum-sensing system produces and responds to *N*-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone. J Bacteriol **190**: 5137-5141.

DUERKOP, B. A. , R. L. ULRICH et E. P. GREENBERG. 2007. Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-BmaI1 quorum sensing. J Bacteriol **189**: 5034-5040.

DUERKOP, B. A. , J. VARGA , J. R. CHANDLER , S. B. PETERSON , J. P. HERMAN , M. E. A. CHURCHILL , M. R. PARSEK , W. C. NIERMAN et E. P. GREENBERG. 2009. Quorum-Sensing Control of Antibiotic Synthesis in *Burkholderia thailandensis*. J Bacteriol **191**(12): 3909-3918.

DUNLAP, P. V. 1999. Quorum Regulation of Luminescence in *Vibrio fischeri*. J Molec Microbiol Biotechnol **1**(1): 5-12.

EBERL, L. 2006. Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. Int J Med Microbiol **296**(2-3): 103-110.

EBERL, L. , S. MOLIN et M. GIVSKOV. 1999. Surface Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J Bacteriol **181**(6): 1703-1712.

EDWARDS, J. R. et J. A. HAYASHI. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Biochem Biophys **111**(2): 415-421.

ESPINOSA-URGEL, M. 2003. Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. J Bacteriol **185**(3): 699-700.

GAUTAM, K. K. et V. K. TYAGI. 2006. Microbial Surfactants: A Review. Journal of Oleo Science **55**(4): 155-166.

GENNIP, M. V. , L. D. CHRISTENSEN , M. ALHEDE , R. PHIPPS , P. O. JENSEN , L. CHRISTOPHERSEN , S. J. PAMP , C. MOSER , P. J. MIKKELSEN , A. Y. KOH , T. TOLKER-NIELSEN , G. B. PIER , N. HØIBY , M. GIVSKOV et T. BJARNSHOLT. 2009. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. APMIS **117**(7): 537-546.

GEORGE, A. M. , P. M. JONES et P. G. MIDDLETON. 2009. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. FEMS Microbiology Letters: 1-12.

GEORGIOU, G. , S.-C. LIN et M. M. SHARMA. 1992. Surface-Active Compounds from Microorganisms. Nat Biotech **10**(1): 60-65.

GLASS, M. B. , J. E. GEE , A. G. STEIGERWALT , D. CAVUOTI , T. BARTON , R. D. HARDY , D. GODOY , B. G. SPRATT , T. A. CLARK et P. P. WILKINS. 2006. Pneumonia and Septicemia Caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. J Clin Microbiol **44**(12): 4601-4604.

GOTSCHLICH, A. , B. HUBER , O. GEISENBERGER , A. TÖGL , A. STEIDLE , K. RIEDEL , P. HILL , B. TÜMMLER , P. VANDAMME , B. MIDDLETON , M. CAMARA , P. WILLIAMS , A. HARDMAN et L. EBERL. 2001. Synthesis of Multiple *N*-Acylhomoserine Lactones is Wide-spread Among the Members of the *Burkholderia cepacia* Complex. Systematic and Applied Microbiology **24**(1): 1-14.

GOVAN, J. et V. DERETIC. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev **60**(3): 539-574.

GOVAN, J. R. W. , C. J. DOHERTY , J. W. NELSON , P. H. BROWN , A. P. GREENING , J. MADDISON , M. DODD et A. K. WEBB. 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. The Lancet **342**(8862): 15-19.

GOVAN, J. R. W. et J. W. NELSON. 1992. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. Br Med Bull **48**(4): 912-930.

GUERRA-SANTOS, L. H. , O. KÄPPELI et A. FIECHTER. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied Microbiology and Biotechnology **24**(6): 443-448.

GUNTHER, N. W., IV , A. NUNEZ , W. FETT et D. K. Y. SOLAIMAN. 2005. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. Appl Environ Microbiol **71**(5): 2288-2293.

HAUSER, G. et M. L. KARNOVSKY. 1957. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem **224**(1): 91-105.

HAUSER, G. et M. L. KARNOVSKY. 1958. Studies on the Biosynthesis of L-Rhamnose. J Biol Chem **233**(2): 287-291.

HÄUßLER, S. , M. NIMTZ , T. DOMKE , V. WRAY et I. STEINMETZ. 1998. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun **66**(4): 1588-1593.

HÄUßLER, S. , M. ROHDE , N. VON NEUHOFF , M. NIMTZ et I. STEINMETZ. 2003. Structural and Functional Cellular Changes Induced by *Burkholderia pseudomallei* Rhamnolipid. Infect Immun **71**(5): 2970-2975.

HÄUßLER, S. et B. T. 2008. The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in *Pseudomonas aeruginosa* Populations. PLoS Pathog **4**(9): e1000166. doi:1000110.1001371/journal.ppat.1000166.

HENRICHSEN, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. Bacteriol Rev **36**(4): 478-503.

HIRATA, Y. , M. RYU , Y. ODA , K. IGARASHI , A. NAGATSUKA , T. FURUTA et M. SUGIURA. 2009. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. Journal of Bioscience and Bioengineering **108**(2): 142-146.

HIRAYAMA, T. et I. KATO. 1982. Novel Methyl Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Letters **139**(1): 81-85.

HUBER, B. , K. RIEDEL , M. HENTZER , A. HEYDORN , A. GOTSCHLICH , M. GIVSKOV , S. MOLIN et L. EBERL. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology **147**(Pt 9): 2517-2528.

INOUE, S. et S. ITO. 2004. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentations Biotechnology Letters **4**(1): 3-8.

ISLES, A. , I. MACLUSKY , M. COREY , R. GOLD , C. PROBER , P. FLEMING et H. LEVISON. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: An emerging problem. The Journal of Pediatrics **104**(2): 206-210.

JACOBS, J. L. , A. C. FASI , A. RAMETTE , J. J. SMITH , R. HAMMERSCHMIDT et G. W. SUNDIN. 2008. Identification and Onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from the Onion Rhizosphere and Onion Field Soil. Appl Environ Microbiol **74**(10): 3121-3129.

JANDER, G. , L. G. RAHME et F. M. AUSUBEL. 2000. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. J Bacteriol **182**(13): 3843-3845.

JAROSZ, J. 1995. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* proteinase with the inducible non-self response system of insects. Cytobios **83**: 71-84.

JARRELL, K. F. et A. M. KROPINSKI. 1982. The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. J Invertebr Pathol **39**: 395-400.

JARVIS, F. G. et M. J. JOHNSON. 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J Am Oil Chem Soc **71**(12): 4124-4126.

JENSEN, P. O. , T. BJARNSHOLT , R. PHIPPS , T. B. RASMUSSEN , H. CALUM , L. CHRISTOFFERSEN , C. MOSER , P. WILLIAMS , T. PRESSLER , M. GIVSKOV et N. HOIBY. 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa. Microbiology **153**(5): 1329-1338.

JOHNSON, M. K. et D. BOESE-MARRAZZO. 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun **29**(3): 1028-1033.

KIM, H. S. , M. A. SCHELL , Y. YU , R. L. ULRICH , S. H. SARRIA , W. C. NIERMAN et D. DESHAZER. 2005. Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. BMC Genomics **6**: 174.

KITAMOTO, D. , H. ISODA et T. NAKAHARA. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. J Biosci Bioeng **94**(3): 187-201.

KOCH, A. K. , O. KÄPPELI , A. FIECHTER et J. REISER. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in Pseudomonas aeruginosa mutants. J Bacteriol **173**(13): 4212-4219.

KÖHLER, T. , L. K. CURTY , F. BARJA , C. VAN DELDEN et J.-C. PECHÈRE. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. J Bacteriol **182**(21): 5990-5996.

KOSARIC, N. 1992. Biosurfactants in industry. Pure Applied Chem **64**(11): 1731-1737.

KOWNATZKI, R. , B. TUMMLER et G. DORING. 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. Lancet **1**: 1026-1027.

LAI, S. , J. TREMBLAY et E. DEZIEL. 2009. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. Environ Microbiol **11**(1): 126-136.

LANG, S. et J. PHILP. 1998. Surface-active lipids in rhodococci *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 59–70.

LEELARASAMEE, A. et S. BOVORNKITTI. 1989. Melioidosis: Review and Update. Rev Infect Dis **11**(3): 413-425.

LÉPINE, F. , E. DÉZIEL , S. MILOT et L. G. RAHME. 2003. A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in Pseudomonas aeruginosa cultures. Biochim Biophys Acta **1622**(1): 36-41.

LÉPINE, F. , E. DÉZIEL , S. MILOT et R. VILLEMUR. 2002. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. J Mass Spectrom **37**(1): 41-46.

LEQUETTE, Y. et E. P. GREENBERG. 2005. Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. J Bacteriol **187**(1): 37-44.

LEWENZA, S. , B. CONWAY , E. P. GREENBERG et P. A. SOKOL. 1999. Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologs CepRI. J Bacteriol **181**(3): 748-756.

LEWENZA, S. et P. A. SOKOL. 2001. Regulation of Ornibactin Biosynthesis and *N*-Acyl-L-Homoserine Lactone Production by CepR in *Burkholderia cepacia*. J Bacteriol **183**(7): 2212-2218.

LIBERATI, N. T. , J. M. URBACH , S. MIYATA , D. G. LEE , E. DRENKARD , G. WU , J. VILLANUEVA , T. WEI et F. M. AUSUBEL. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2833-2838.

LIN, C. H. , G. BOURQUE et P. TAN. 2008. A Comparative Synteny Map of *Burkholderia* Species Links Large-Scale Genome Rearrangements to Fine-Scale Nucleotide Variation in Prokaryotes. Mol Biol Evol **25**(3): 549-558.

LIN, S.-C. 1996. Biosurfactants: Recent Advances. J Chem Tech Biotechnol **66**: 109-120.

LINDUM, P. W. , U. ANTHONI , C. CHRISTOPHERSEN , L. EBERL , S. MOLIN et M. GIVSKOV. 1998. N-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of Serratia liquefaciens MG1. J Bacteriol **180**(23): 6384-6388.

LIPUMA, J. J. 2007. Update on *Burkholderia* nomenclature and resistance. Clinical Microbiology Newsletter **29**(9): 65-69.

LIPUMA, J. J. , J. E. MORTENSEN , S. E. DASEN , T. D. EDLIND , D. V. SCHIDLOW , J. L. BURNS et T. L. STULL. 1988. Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. The Journal of pediatrics **113**(5): 859-862.

LOURITH, N. et M. KANLAYAVATTANAKUL. 2009. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. International Journal of Cosmetic Science **31**(4): 255-261.

LUTTER, E. , S. LEWENZA , J. J. DENNIS , M. B. VISSER et P. A. SOKOL. 2001. Distribution of Quorum-Sensing Genes in the *Burkholderia cepacia* Complex. Infect Immun **69**(7): 4661-4666.

LYSENKO, O. 1963. The mechanisms of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula 1. The pathogenicity of strain N-06 for the larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus). J Insect Pathol **5**: 78-82.

MAHENTHIRALINGAM, E. , A. BALDWIN et P. VANDAMME. 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol **51**(7): 533-538.

MAHENTHIRALINGAM, E. , M. CAMPBELL , D. HENRY et D. SPEERT. 1996. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. J Clin Microbiol **34**(12): 2914-2920.

MAHENTHIRALINGAM, E. , T. A. URBAN et J. B. GOLDBERG. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nat Rev Microbiol **3**(2): 144-156.

MAKULA, R. A. , R. E. TORREGROSSA et H. B. ISLE. 1978. Identification and synthesis of acyl-phosphatidylglycerol in *Acinetobacter* sp. HO1-N. J Bacteriol **133**(3): 1530–1532.

MALOTT, R. J. , A. BALDWIN , E. MAHENTHIRALINGAM et P. A. SOKOL. 2005. Characterization of the *cciIR* Quorum-Sensing System in *Burkholderia cenocepacia*. Infect Immun **73**(8): 4982-4992.

MATSUYAMA, T. , M. FUJITA et I. YANO. 1985. Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. FEMS Microbiology Letters **28**(1): 125-129.

MATSUYAMA, T. , K. KANEDA , I. ISHIZUKA , T. TOIDA et I. YANO. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. Journal of bacteriology **172**(6): 3015-3022.

MCCLURE, C. et N. SCHILLER. 1992. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. J Leukoc Biol **51**(2): 97-102.

MCKENNEY, D. , K. BROWN et D. ALLISON. 1995. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. J Bacteriol **177**(23): 6989-6992.

MILLER, R. M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. Environ Health Perspect **103**(1): 59-62.

MIYATA, S. , M. CASEY , D. W. FRANK , F. M. AUSUBEL et E. DRENKARD. 2003. Use of the *Galleria mellonella* Caterpillar as a Model Host To Study the Role of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. Infect Immun **71**(5): 2404-2413.

MOURA, J. A. , M. CRISTINA DE ASSIS , G. C. VENTURA , A. M. SALIBA , L. GONZAGA JR , M. SI-TAHAR , E. D. A. MARQUES et M. C. PLOTKOWSKI. 2008. Differential interaction of bacterial species from the *Burkholderia cepacia* complex with human airway epithelial cells. Microbes and Infection **10**(1): 52-59.

MULLIGAN, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut **133**(2): 183-198.

MUNSON, B. R. , D. F. YOUNG et T. H. OKIISHI. 2007. Fundamentals of Fluid Mechanics. India Edition, Wiley 24-25.

MURATA, Y. , Y. MAEDA , H. KUNIYASU , T. YAMAGUCHI , M. TANAKA , R. SHIMOZAWA , H. WAKITA et Y. TABATA. 1997. Effects of temperature and chain lenght on the properties of long chain polyoxyethylene dodecyl ethers in aqueous solution. Progr Colloid Polym Sci **106**: 70-74.

NEALSON, K. H. 1977. Autoinduction of bacterial luciferase. Archives of Microbiology **112**(1): 73-79.

NEU, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiol Rev **60**(1): 151-166.

NEUBAUER, H. , L. D. SPRAGUE , R. ZACHARIA , H. TOMASO , S. AL DAHOUK , R. WERNERY , U. WERNERY et H. C. SCHOLZ. 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* Infections in Horses: State-of-the-art and Perspectives. Journal of Veterinary Medicine Series B **52**(5): 201-205.

NITSCHKE, M. , S. COSTA et J. CONTIERO. 2005. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol Prog **21**: 1593 - 1600.

OCHSNER, U. , A. FIECHTER et J. REISER. 1994a. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J Biol Chem **269**(31): 19787-19795.

OCHSNER, U. A. , A. K. KOCH , A. FIECHTER et J. REISER. 1994b. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **176**(7): 2044-2054.

OCHSNER, U. A. et J. REISER. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6424-6428.

ONG, C. , C. H. OOI , D. WANG , H. CHONG , K. C. NG , F. RODRIGUES , M. A. LEE et P. TAN. 2004. Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species. Genome Res **14**(11): 2295-2307.

PAMP, S. J. et T. TOLKER-NIELSEN. 2007. Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **189**(6): 2531-2539.

PANDIT, N. K. et J. M. STRYKOWSKI. 1989. Effect of pH and temperature on the solubility of a surface active carboxylic acid. Journal of Pharmaceutical Sciences **78**(9): 767-770.

PELEG, A. Y. , S. JARA , D. MONGA , G. M. ELIOPOULOS , R. C. MOELLERING, JR. et E. MYLONAKIS. 2009. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2605-2609.

PESCI, E. , J. PEARSON , P. SEED et B. IGLEWSKI. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **179**(10): 3127-3132.

RAHIM, R. , U. A. OCHSNER , C. OLVERA , M. GRANINGER , P. MESSNER , J. S. LAM et G. SOBERON-CHAVEZ. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol Microbiol **40**(3): 708-718.

RAHMAN, A. et C. W. BROWN. 1983. Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate. Journal of Applied Polymer Science **28**(4): 1331-1334.

RAHMAN, K. S. , T. J. RAHMAN , S. MCCLEAN , R. MARCHANT et I. M. BANAT. 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of Pseudomonas aeruginosa using low-cost raw materials. Biotechnol Prog **18**(6): 1277-1281.

RAHMAN, P. K. S. M. et E. GAKPE. 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. Biotechnology **7**(2): 360-370.

RAHME, L. , E. STEVENS , S. WOLFORT , J. SHAO , R. TOMPKINS et F. AUSUBEL. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science **268**(5219): 1899-1902.

READ, R. C. , P. ROBERTS , N. MUNRO , A. RUTMAN , A. HASTIE , T. SHRYOCK , R. HALL , W. MCDONALD-GIBSON , V. LUND , G. TAYLOR et A. ET. 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. J Appl Physiol **72**(6): 2271-2277.

REAMS, A. B. et E. L. NEIDLE. 2004. Selection for gene clustering by tandem duplication. Annu Rev Microbiol **58**: 119-142.

REHM, B. H. A. , N. KRUGER et A. STEINBUCHEL. 1998. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. J Biol Chem **273**(37): 24044-24051.

ROBERT, M. , M. E. MERCADÉ , M. P. BOSCH , J. L. PARRA , M. J. ESPUNY , M. A. MANRESA et J. GUINEA. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnol Lett **11**: 871-874.

ROMANO, J. D. et S. MICHAELIS. 2001. Topological and Mutational Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, Founding Member of the Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Family. Mol Biol Cell **12**(7): 1957-1971.

RON, E., Z., et E. ROSENBERG. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation Current Opinion in Biotechnology **13**(3): 249-252.

ROSENBERG, E. et E. Z. RON. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol **52**(2): 154-162.

ROTZ, L. D. , A. S. KHAN , S. R. LILLIBRIDGE , S. M. OSTROFF et J. M. HUGHES. 2002. Public Health Assessment of Potential Biological Terrorism Agents. Emerg Infect Dis **8**(2): 225-230.

SAIMAN, L. , G. CACALANO et A. PRINCE. 1990. *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun **58**(8): 2578-2584.

SAINI, H. S. , B. E. BARRAGÁN-HUERTA , A. LEBRÓN-PALER , J. E. PEMBERTON , R. R. VÁZQUEZ , A. M. BURNS , M. T. MARRON , C. J. SELIGA , A. A. L. GUNATILAKA et R. M. MAIER. 2008. Efficient Purification of the Biosurfactant Viscosin from *Pseudomonas libanensis* Strain M9-3 and Its Physicochemical and Biological Properties. Journal of Natural Products **71**(6): 1011-1015.

SCHELL, M. A. , L. LIPSCOMB et D. DESHAZER. 2008. Comparative Genomics and an Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia mallei*. J Bacteriol **190**(7): 2306-2313.

SCHENK, T. , I. SCHUPHAN et B. SCHMIDT. 1995. High-performance Liquid Chromatographic determination of the rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa. J Chromatogr A **693**: 7 - 13.

SCHUSTER, M. et E. PETER GREENBERG. 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Medical Microbiology **296**(2-3): 73-81.

SEED, K. D. et J. J. DENNIS. 2008. Development of *Galleria mellonella* as an Alternative Infection Model for the *Burkholderia cepacia* Complex. Infect Immun **76**(3): 1267-1275.

SHARMA, M. et S. K. ANAND. 2002. Swarming: A coordinated bacterial activity. Curr Sci **83**: 707-715.

SIM, S. H. , Y. YU , C. H. LIN , R. K. KARUTURI , V. WUTHIEKANUN , A. TUANYOK , H. H. CHUA , C. ONG , S. S. PARAMALINGAM , G. TAN , L. TANG , G. LAU , E. E. OOI , D. WOODS , E. FEIL , S. J. PEACOCK et P. TAN. 2008. The core and accessory genomes of *Burkholderia pseudomallei*: implications for human melioidosis. PLoS Pathog **4**(10): e1000178.

SIMON, R. , U. PRIEFER et A. PUHLER. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotech **1**(9): 784-791.

SINGH, A. , J. D. VAN HAMME et O. P. WARD. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances **25**(1): 99-121.

SINGH, P. B. , S. SHARMA , H. S. SAINI et B. S. CHADHA. 2009. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. Letters in Applied Microbiology **49**(3): 378-383.

SOBERON-CHAVEZ, G. , F. LEPINE et E. DEZIEL. 2005. Production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa. Appl Microbiol Biotechnol **68**(6): 718-725.

SOLAIMAN, D., K. Y., , R. ASHBY, D. , , A. NUNEZ et A. T. FOGLIA. 2004. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. Biotechnology Letters **26**: 1241-1245.

SONG, Y. , C. XIE , Y.-M. ONG , Y.-H. GAN et K.-L. CHUA. 2005. The BpsIR Quorum-Sensing System of *Burkholderia pseudomallei*. J Bacteriol **187**(2): 785-790.

SPRINGMAN, A. C. , J. L. JACOBS , V. S. SOMVANSHI , G. W. SUNDIN , M. H. MULKS , T. S. WHITTAM , P. VISWANATHAN , R. L. GRAY , J. J. LIPUMA et T. A. CICHE. 2009. Genetic Diversity and Multihost Pathogenicity

of Clinical and Environmental Strains of *Burkholderia cenocepacia*. Appl Environ Microbiol **75**(16): 5250-5260.

STOYANOVA, M. , I. PAVLINA , P. MONCHEVA et N. BOGATZEVSKA. 2007. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. Biotechnol & Biotechnol 306-310.

SUGIHARA, G. , K. YAMAKAWA , Y. MURATA et M. TANAKA. 2002. Effects of pH, pNa, and temperature on micelle formation and solubilization of cholesterol in aqueous solutions of bile salts. The Journal of Physical Chemistry **86**(14): 2784-2788.

SYLDATK, C. , S. LANG , F. WAGNER , V. WRAY et L. WITTE. 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from Pseudomonas spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. Z Naturforsch [C] **40**(1-2): 51-60.

THONGDEE, M. , L. A. GALLAGHER , M. SCHELL , T. DHARAKUL , S. SONGSIVILAI et C. MANOIL. 2008. Targeted mutagenesis of Burkholderia thailandensis and Burkholderia pseudomallei through natural transformation of PCR fragments. Appl Environ Microbiol **74**(10): 2985-2989.

TOKIWA, F. et K. OHKI. 1968. The effect of temperature on the surface potentials of surfactant micelles Colloid & Polymer Science **223**(2): 135-138.

TREMBLAY, J. , A. P. RICHARDSON , F. LÉPINE et E. DÉZIEL. 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. Environ Microbiol **9**(10): 2622-2630.

TRUMMLER, K. , F. EFFENBERGER et C. SYLDATK. 2003. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with Pseudomonas sp DSM 2874. Eur J Lipid Sci Technol **105**: 563-571.

TSUGE, K. , Y. OHATA et M. SHODA. 2001. Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3566-3573.

TULEVA, B. K. , G. R. IVANOV et N. E. CHRISTOVA. 2002. Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. Z Naturforsch **57 c**(3-4): 356-360.

UEHLINGER, S. , S. SCHWAGER , S. P. BERNIER , K. RIEDEL , D. T. NGUYEN , P. A. SOKOL et L. EBERL. 2009. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains using multiple infection hosts. Infect Immun **77**(9): 4102-4110.

ULRICH, R. L. , D. DESHAZER , E. E. BRUEGGEMANN , H. B. HINES , P. C. OYSTON et J. A. JEDDELOH. 2004a. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. J Med Microbiol **53**(11): 1053-1064.

ULRICH, R. L. , D. DESHAZER , H. B. HINES et J. A. JEDDELOH. 2004b. Quorum Sensing: a Transcriptional Regulatory System Involved in the Pathogenicity of *Burkholderia mallei*. Infect Immun **72**(11): 6589-6596.

ULRICH, R. L. , H. B. HINES , N. PARTHASARATHY et J. A. JEDDELOH. 2004c. Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. J Bacteriol **186**(13): 4350-4360.

VALADE, E. , F. M. THIBAULT , Y. P. GAUTHIER , M. PALENCIA , M. Y. POPOFF et D. R. VIDAL. 2004. The PmlI-PmlR Quorum-Sensing System in *Burkholderia pseudomallei* Plays a Key Role in Virulence and Modulates Production of the MprA Protease. J Bacteriol **186**(8): 2288-2294.

VAN DELDEN, C. et B. H. IGLEWSKI. 1998. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg Infect Dis **4**(4): 551-560.

VANDAMME, P. , B. HOLMES , T. COENYE , J. GORIS , E. MAHENTHIRALINGAM , J. J. LIPUMA et J. R. W. GOVAN. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. Research in Microbiology **154**(2): 91-96.

VANDAMME, P. , B. HOLMES , M. VANCANNEYT , T. COENYE , B. HOSTE , R. COOPMAN , H. REVETS , S. LAUWERS , M. GILLIS , K. KERSTERS et J. R. W. GOVAN. 1997. Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol **47**(4): 1188-1200.

VANLAERE, E. , J. J. LIPUMA , A. BALDWIN , D. HENRY , E. DE BRANDT , E. MAHENTHIRALINGAM , D. SPEERT , C. DOWSON et P. VANDAMME. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol **58**(7): 1580-1590.

VASILEVA-TONKOVA, E. , D. GALABOVA , E. STOIMENOVA et Z. LALCHEV. 2006. Production and Properties of Biosurfactants from a Newly Isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 Growing on Hexadecane. Z Naturforsch **61 c**: 553-559.

VENTURI, V. , A. FRISCINA , I. BERTANI , G. DEVESCOVI et C. AGUILAR. 2004. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. Res Microbiol **155**(4): 238-244.

VIAL, L. , M.-C. GROLEAU , M. G. LAMARCHE , G. FILION , J. CASTONGUAY-VANIER , V. DEKIMPE , F. DAIGLE , S. J. CHARETTE et E. DEZIEL. 2009. Phase variation has a role in *Burkholderia ambifaria* niche adaptation. ISME J.

VIAL, L. , F. LÉPINE , S. MILOT , M. C. GROLEAU , V. DEKIMPE , D. E. WOODS et E. DÉZIEL. 2008. *Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. J Bacteriol **190**(15): 5339-5352.

WATTANAPHON, H. T. , A. KERDSIN , C. THAMMACHAROEN , P. SANGVANICH et A. S. VANGNAI. 2008. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. J Appl Microbiol **105**(2): 416-423.

WHITLOCK, G. C. , D. M. ESTES et A. G. TORRES. 2007. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiology Letters **277**(2): 115-122.

WINSLOW, C.-E. A. , J. BROADHURST , R. E. BUCHANAN , C. KRUMWIEDE, JR. , L. A. ROGERS et G. H. SMITH. 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. J Bacteriol **5**(3): 191-229.

WOODS, D. E. 2002. The use of animal infection models to study the pathogenesis of melioidosis and glanders. Trends in Microbiology **10**(11): 483-484.

WOPPERER, J. , S. T. CARDONA , B. HUBER , C. A. JACOBI , M. A. VALVANO et L. EBERL. 2006. A Quorum-Quenching Approach To Investigate the Conservation of Quorum-Sensing-Regulated Functions within the *Burkholderia cepacia* Complex. Appl Environ Microbiol **72**(2): 1579-1587.

YABUUCHI, E. , Y. KOSAKO , H. OYAIZU , I. YANO , H. HOTTA , Y. HASHIMOTO , T. EZAKI et M. ARAKAWA. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol **36**: 1251-1275.

YAKIMOV, M. M. , K. N. TIMMIS , V. WRAY et H. L. FREDRICKSON. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl Environ Microbiol **61**(5): 1706–1713.

YU, H. , M. HANES , C. E. CHRISP , J. C. BOUCHER et V. DERETIC. 1998. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Pulmonary Clearance of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Inflammation in a Mouse Model of Repeated Respiratory Challenge. Infect Immun **66**(1): 280-288

YU, Y. , H. S. KIM , H. H. CHUA , C. H. LIN , S. H. SIM , D. LIN , A. DERR , R. ENGELS , D. DESHAZER , B. BIRREN , W. C. NIERMAN et P. TAN. 2006. Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. BMC Microbiol **6**: 46.

ZHANG, J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. Trends in Ecology & Evolution **18**(6): 292-298.

ZHANG, L. , P. SOMASUNDARAN , S. K. SINGH , A. P. FELSE et R. GROSS. 2004. Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **240**(1-3): 75-82.

ZHU, K. et C. O. ROCK. 2008. RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **190**(9): 3147-3154.

ZULIANELLO, L. , C. CANARD , T. KOHLER , D. CAILLE , J.-S. LACROIX et P. MEDA. 2006. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun **74**(6): 3134-3147.