### Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

# LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION DES RHAMNOLIPIDES CHEZ BURKHOLDERIA THAILANDENSIS

### Par Adeline Humery

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

### Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

**Philippe Constant** 

**INRS-Institut Armand-Frappier** 

Examinateur externe

Josée Harel

Département de Pathologie et Microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire,

Université de Montréal

Directeur de recherche

Eric Déziel

**INRS-Institut Armand-Frappier** 

### RÉSUMÉ

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles possédant d'excellentes propriétés tensioactives. Ils ont été exhaustivement étudiés chez Pseudomonas aeruginosa dû à leurs rôles dans les comportements multicellulaires de cette bactérie et à leur potentiel commercial comme surfactants alternatifs. Des gènes orthologues à rhIA, rhIB et rhIC, qui sont responsables de la production de rhamnolipides chez P. aeruginosa, ont été découverts chez Burkholderia thailandensis. Cette bactérie, contrairement à P. aeruginosa, contient les trois gènes au sein d'un même opéron qui existe en deux copies paralogues et fonctionnelles (quoiqu'une copie semble contribuer davantage à la production totale de rhamnolipides). L'objectif de ce projet est d'investiguer les facteurs régulant la transcription des opérons rhl chez B. thailandensis. Puisque la communication intercellulaire (quorum sensing ou QS) est connue pour activer la production des rhamnolipides chez P. aeruginosa, l'hypothèse qu'un tel système opère aussi chez B. thailandensis a été explorée en testant différents mutants du QS pour leur production de rhamnolipides (caractérisés et quantifiés par LC/MS). Curieusement, il semblerait que la communication cellulaire chez B. thailandensis réprime la production de rhamnolipides car certains mutants réussissent à en produire jusqu'à dix fois plus que la souche sauvage. Cependant, la régulation par le QS ne semble pas uniquement directe. Grâce à la construction de différents rapporteurs transcriptionnels de type fusion-lacZ transférés dans la souche sauvage et dans certains mutants intéressants du QS, la régulation de chaque opéron à partir des promoteurs rhIA1 et rhIA2 a été étudiée ainsi que leur implication respective dans la production totale de rhamnolipides. Les résultats confirment que l'un des opérons est davantage exprimé et davantage sensible au QS. Afin d'identifier le(s) régulateur(s) direct(s), deux axes de recherche ont été investigués : (1) par mutagénèse aléatoire de ces souches avec rapporteurs via un transposon suivi du criblage de mutants, (2) en étudiant (bioinformatique et technique du 5'RACE) et en utilisant les régions promotrices pour piéger les éventuelles molécules régulatrices. Les résultats de ce deuxième axe de recherche semblent conforter l'importance du QS dans la régulation des opérons, mais sous-entendent une interaction directe avec les régions promotrices. En parallèle, les différentes cinétiques effectuées ont souligné une corrélation entre la croissance et le niveau de production des rhamnolipides suggérant un coût énergétique important pour leur synthèse chez B. thailandensis.

Adeline Humery

Étudiante

Éric Déziel

Directeur de recherche



### REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le point culminant d'un travail long et pour le moins délicat. Il n'est pas seulement le mien mais également celui de tous ceux qui ont bien voulu m'apporter leur aide, sous quelque forme que ce soit.

Alors oui, comme tout le monde, je vais commencer par remercier très chaleureusement mon directeur de recherche, Éric Déziel pour m'avoir accueillie dans son labo et pour avoir cru en moi malgré les coups du sort. Qui aurait cru que quelques échanges au badminton m'auraient amenée jusque devant une de tes paillasses ? Merci aussi d'avoir bien voulu me laisser tester mes idées farfelues même si tu n'y croyais pas vraiment. Je suis ravie d'avoir pu rejoindre ta fine équipe d'étudiants et d'avoir pu apprendre tant de choses grâce à toi.

Au moment où j'ai cru n'avoir aucun don en sciences, Marie-Christine est également venue à mon secours pour me rassurer en accusant la terrible et récalcitrante *B. thailandensis*. MC, j'ai trouvé en toi une véritable amie et j'en suis très heureuse. Nos discussions et nos fous rires vont certainement me manquer mais ils ont la force de me faire sourire encore aujourd'hui. Je te remercie pour tout.

J'ai passé tellement de bons moments dans ce labo que je n'aurais finalement pas voulu partir. Mariane, David, Annelise, Elyna, Martin, Ahmad, Carlos, Valérie, ... et tous ceux du groupe de Microbiologie de l'Environnement que j'oublie, que j'ai croisés trop rapidement... il y en a tellement! Merci à vous tous. Désolée de vous avoir embêté avec mes problèmes, désolée aussi pour mes éclats de rire quelque peu sonores.

Merci à François Lépine de m'avoir permis d'abimer quelques colonnes de chromatographie au CL/SM avec mes échantillons bizarres. Et merci à Sylvain Milot de les avoir réparées!! Et de m'avoir aidé sans relâche pour trouver des solutions. Votre patience aura été un précieux atout. Merci à Jonathan Perrault pour ses judicieux conseils sur le 5'RACE, les ARN et autres logiciels informatiques de repliement d'oligos. Ma gratitude va également à la Fondation Armand-Frappier, à la compagnie Lallemand, ainsi qu'au Ministère du Développement Économique, de l'Innovation et de l'Exportation pour le soutien financier qu'ils m'ont octroyé pendant mes travaux.

Merci également à Rima Habib que j'ai rencontré à l'Institut et qui est devenue une excellente amie. Ton soutien, tes encouragements, nos conversations dos à dos dans nos bureaux, ... Grâce à toi, les heures de travail devant mon ordinateur sont devenues bien moins pesantes. Je pense fort à toi.

Au risque de paraître « vieux jeu », je vais aussi prendre le temps de remercier mes parents. Bien que complètement étrangers au domaine que je côtoie aujourd'hui, vous avez l'immense mérite de m'avoir portée et encouragée depuis mes tout débuts. Vous m'avez fait comprendre que les obstacles d'une vie peuvent aussi en être les tremplins. Vous m'avez donné confiance en moi et avez toujours cru en mes capacités. Vous avez toute ma gratitude et j'espère que vous serez toujours fiers de moi.

Enfin, je pense à mon fiancé, Jean-François. Toute cette histoire a commencé par ta « faute »! Je n'avais pas vraiment prévu de passer une partie de ma vie au Québec. Mais c'était sans compter sur les aléas de la vie. Quoi que tu puisses en penser, faire cette maîtrise m'a énormément apporté, autant en technique, en pratique, qu'en confiance de soi. Et elle m'a aussi permis de pouvoir construire ma vie avec toi. Nous avons aujourd'hui quitté le Québec et, depuis plusieurs mois, tu m'encourages tous les jours à rédiger ce mémoire. Ton écoute, ton soutien et ton amour auront eu raison de mes faiblesses, de mes frustrations et de mes colères face aux pages blanches. Je te remercie du fond du cœur et te remercierai encore longtemps. Je t'aime.

# TABLE DES MATIÈRES

Résumé	IV
Remerciements	VII
Table des Matières	IX
Liste des Figures	ΚV
Liste des TableauxXV	/111
Liste des Abréviations	ΊX
Introduction	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	5
I.1. Les surfactants	6
I.1.1. Propriétés amphiphiles des surfactants	6
I.1.2. Tension superficielle et tension interfaciale	7
I.1.3. Concentration micellaire critique (CMC) et propriétés tensioactives des surfactants	7
I.1.4. Classification des surfactants	9
I.1.4.1. Les tensioactifs anioniques	<i>9</i>
I.1.4.2. Les tensioactifs cationiques	
I.1.4.3. Les tensioactifs zwitterioniques	
I.1.4.4. Les tensioactifs non ioniques	10
I.1.5. Domaines d'application des tensioactifs et marché mondial	10
I.1.6. Les biosurfactants	15
I.1.6.1. Types de biosurfactants	15
I.1.6.2. L'avenir commercial des biosurfactants	
I.2. Les rhamnolipides	18
12.1 Structure des rhampolipides	19

1.2.2.	Rôles des rhamnolipides pour les organismes producteurs	.20
1.2.2.	1. Facteurs de virulence	.22
1.2.2.2	2. Motilité de surface ou « swarming »	.23
1.2.2.3		
1.2.2.4		
1.2.2.5	5. Biodégradation d'hydrocarbures	.24
1.2.3.	Facteurs affectant la production de rhamnolipides	.25
1.2.3.1	1. La source de carbone	.25
1.2.3.2	2. La source d'azote	.26
1.3. Les	s organismes producteurs et biosynthèse des rhamnolipides	26
I.3.1.	Pseudomonas aeruginosa	.27
1.3.2.	Le genre Burkholderia	.28
1.3.2.1	1. Burkholderia pseudomallei	.31
1.3.2.2	2. Burkholderia thailandensis	32
1.3.3.	Biosynthèse des rhamnolipides	.33
1.3.3.1	I. Gènes responsables de la biosynthèse	33
1.3.3.2	2. Voie de biosynthèse	35
1.3.3	3.2.1. Découverte chez P. aeruginosa	.35
1.3.3	3.2.2. Chez B. thailandensis	.38
1.4. Le d	quorum sensing (QS) et la production de rhamnolipides	39
1.4.1.	Principe du QS	39
1.4.1.1	Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR	43
1.4.2.	Le QS chez les bactéries du genre Burkholderia	44
1.4.2.1	. Généralités sur le QS des Bcc	44
1.4.2.2	2. Le QS de B. pseudomallei et B. mallei	45
1.4.2.3	Le QS de B. thailandensis	46
1.4.2	2.3.1. Systèmes BtaRI	47
1.4.2	2.3.2. Système des HMAQ	48
1.4.3.	Lien entre QS et production de rhamnolipides chez B. thailandensis: résulta	ats
	préliminaires	49
l.5. La F	Problématique	En
1.5.1.	Les hypothèses du projet	50
1.5.2.	Les objectifs et axes de recherche	50

CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES53
II.1. Souches bactériennes, plasmides, et conditions de culture54
II.1.1. Souches bactériennes et plasmides54
II.1.2. Milieux et cultures55
II.1.2.1. Milieux de culture liquide55
II.1.2.2. Milieux de culture solide56
II.2. Tests et suivis lors d'une cinétique57
II.2.1. Suivi de la croissance
II.2.2. Suivi de la production de rhamnolipides par chromatographie liquide couplée au
spectromètre de masse (CL/SM)57
II.2.2.1. Préparation de l'échantillon58
II.2.2.2. Principe du CL/SM
II.2.2.3. Paramètres opérationnels de l'appareil60
II.2.3. Dosage de la β-galactosidase61
II.3. Techniques de biologie moléculaire classiques62
II.3.1. Extraction d'ADN génomique62
II.3.2. Extraction d'ADN plasmidique
II.3.3. Extraction d'ARN total bactérien
II.3.4. Manipulation du matériel génétique64
II.3.4.1. Couper l'ADN : la digestion enzymatique64
II.3.4.2. Joindre des segments d'ADN : la ligation64
II.3.5. Transfert d'ADN dans les cellules bactériennes65
II.3.5.1. Transformation d'E. coli par choc thermique65
II.3.5.2. Transfert chez B. thailandensis par conjugaison avec E. coli66
II.4. Études sur la transcription des opérons67
II.4.1. Identification de site(s) d'initiation de la transcription : 5'RACE67
II.4.1.1. Clonage des produits du 5'RACE69
II.4.1.2. Extraction plasmidique et séquençage69
II.4.2. Création des rapporteurs transcriptionnels de type fusion-lacZ69
ILA 2.1 Conditions de culture des rannorteurs nour les cinétiques

II.5. M	éthodes d'identification des régulateurs directs et indirects des opérons7
II.5.1.	Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production d
	rhamnolipides7
II.5.1.	.1. Mutagénèse aléatoire par transposon
II.5.1.	
II.5.1.	, and a second part of a double for a sequential second se
II.5.2.	Pull down de molécules régulatrices par les régions promotrices fixées sur des bille magnétiques
11.5.2.	
11.5.2.	
II.5.2.	
	liquide couplée au spectromètre de masse77
II.5.3.	Création de systèmes hétérologues chez <i>E. coli</i> SM10 λpir78
II.6. Étu	ides bioinformatiques78
II.6.1.	Logiciel de comparaison de séquences et établissement d'arbres phylogénétiques78
11.6.2.	Logiciel de repliement de séquences génétiques79
II.6.3.	Prédiction de promoteurs79
•	
CHAPITRE III	: RÉSULTATS81
III.1. And	alyses bioinformatiques des séquences génomiques82
III.1.1.	Études comparatives sur les deux opérons rhl de Burkholderia thailandensis E264 sans les
	régions promotrices82
III.1.1.	1. Phylogénie82
111.1.	1.1.1. Pour les gènes <i>rhl</i> individuellement82
	1.1.2. Pour la totalité des régions comprenant les trois gènes <i>rhl</i>
III.1.2.	Études comparatives sur les deux opérons avec les séquences promotrices86
III.1.3.	Études comparatives des séquences intergéniques seules
	1. Similitudes avec d'autres souches87
	2. Entre les deux opérons de B. thailandensis
	3.2.1. Repliements possibles des régions intergéniques en amont des gènes <i>rhl</i>
III.1.4.	Prédiction de promoteurs91

III.2. Effet du quorum sensing sur la régulation de la production des rhamno	lipides94
III.2.1. Mutants du système btaRI	94
III.2.2. Mutants du système des HMAQ	96
III.2.3. Mutants des deux systèmes de QS combinés	97
III.3. Études sur la transcription des opérons	99
III.3.1. Détermination du site d'initiation de la transcription de chaque opéron pa	r 5'RACE99
III.3.2. Cinétiques de la transcription des opérons rhl chez B. thailandensis	100
III.3.2.1. Chez la souche sauvage	100
III.3.2.2. Chez certains des mutants du QS	
III.3.3. Étude d'une régulation croisée entre les deux opérons rhl	106
III.3.3.1. Impact de l'ajout de rhamnolipides sur la production totale	
III.4. Recherche des régulateurs directs ou indirects des opérons	
III.4.1. Pull-Down de molécules régulatrices par les régions intergéniques	
III.4.1.1. Étude de systèmes hétérologues chez E. coli SM10 λpir	
III.4.2. Mutagénèse aléatoire par transposon	
III.4.2.1. Criblage	
III.4.2.2. Séquençage et analyse des produits PCR obtenus	
III.4.2.3. Caractéristiques des transposants affectés dans la transcription de rhlA	
III.4.2.3.1. Les profils « Nuls » de pI-lacZ et de pII-lacZ	
III.4.2.3.2. Les profils « Clairs » de pl-lacZ et pll-lacZ	
III.4.2.3.3. Les profils « Foncés » de pl-lacZ et pll-lacZ	
III.4.2.3.4. Les « WT » de pl-lacZ et pll-lacZ	
CHAPITRE IV : DISCUSSION	123
IV.1. Analyses sur les séquences génomiques des opérons	124
IV.1.1. Phylogénies	124
IV.1.2. Régions promotrices	125
IV.1.2.1. Régions courtes?	128
IV.1.2.2. Régions plus larges?	
IV.2. La transcription des opérons	130
IV.2.1. De l'ADN aux ARNm	130
IV.2.1.1. Les ARNm	131

IV.2.2. La	régulation par le <i>Quorum Sensing</i> 133
IV.2.2.1. IV.2.2.2. IV.2.2.3. IV.2.2.4.	Le rôle de chaque système
IV.2.3. La	régulation croisée des opérons
IV.2.3.1. IV.2.3.2.	La régulation dans le temps
IV.2.4.1. IV.2.4.2.	Discussion sur la méthode de criblage
IV.3. Le coût	t énergétique de la production de rhamnolipides146
Conclusion	
Bibliographie	153
	olutions175
Appendice B : A	morces, réactifs et programmes pour PCR177
Appendice C : V	isualisation des « régions <i>rhl</i> » chez certaines souches du genre <i>Burkholderia</i>
Appendice D : Co	ontexte génomique de l'insertion des transposons

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Schématisation de la corrélation entre la concentration en surfactant et l'abaissement de la tension de surface jusqu'à la CMC8
Figure 2: Production mondiale de surfactants en 2001 par applications (A) et par groupe de surfactants (B)
Figure 3 : Les évolutions réelles et estimées du marché mondial des surfactants en termes de millions de tonnes produits (A) et en termes de revenus générés (B)13
Figure 4 : Cycle des surfactants naturels et synthétiques dans l'histoire14
Figure 5 : Chronologie des premières découvertes sur les différents rôles majeurs des rhamnolipides21
Figure 6 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences recA de certaines espèces du genre Burkholderia et des genres reliés
Figure 7 : Schéma de l'agencement génétique des opérons rhl de B. thailandensis, B. pseudomallei et P. aeruginosa34
Figure 8: Production totale de rhamnolipides par la souche sauvage B. thailandensis E264 ainsi que chacun des mutants simples $\Delta rhlA$ lors d'une culture en milieu NB supplémenté de glycérol (2%)35
Figure 9 : Modèle initial de biosynthèse des rhamnolipides chez P. aeruginosa36
Figure 10: Schématisation de l'agencement des gènes responsables de la production de rhamnolipides et de leur régulation chez P. aeruginosa37
Figure 11 : Voie de biosynthèse des rhamnolipides chez P. aeruginosa38
Figure 12: Représentation schématique du système de régulation densité-dépendante typique, le système de QS luxRI chez V. fischeri
Figure 13 : Le quorum sensing chez Burkholderia thailandensis
Figure 14 : Principe du 5'RACE68
Figure 15 : Processus global de la création d'un rapporteur de type fusion-lacZ70
Figure 16 : Schéma des plasmides et vecteurs utilisés au cours de la construction des rapporteurs de type fusion-lacZ
Figure 17: Plasmide pHBurk3 portant le transposon HimarBP3 entre les séquences répétées inversées

Figure 18: Arbres phylogénétiques créés par le logiciel MEGA sur la base d'alignements MUSCLE des gènes homologues de (A) rhlA, (B) rhlB et (C) rhlC
Figure 19: Arbre phylogénétique élaboré par le logiciel MEGA à partir de l'alignement MUSCLE des séquences d'environ 8 kpb homologues aux opérons rhl de B. thailandensis
Figure 20 : Arbre phylogénétique élaboré par le logiciel MEGA à partir de l'alignement MUSCLE des séquences homologues aux opérons rhl de B. thailandensis, et incluant les régions intergéniques directement en amont
Figure 21 : Schématisation de l'alignement des régions intergéniques en amont des gènes rhlA chez B. thailandensis
Figure 22 : Schématisation des repliements prédits par le logiciel mFold des régions promotrices prhlA1 et prhlA290
Figure 23 : Cinétique de production de dirhamnolipides totaux par les mutants du système btaRI en fonction de la croissance en milieu NB + 4% glycérol94
Figure 24: Cinétique de production de dirhamnolipides totaux du triple mutant btal1,2,3-comparativement aux mutants simples btal- et à la souche sauvage, en fonction de leur croissance. 95
Figure 25 : Cinétique de production des rhamnolipides des mutants hmqA- et hmqR- en comparaison avec la souche sauvage, en fonction de leur croissance96
Figure 26: Cinétiques de production de rhamnolipides des doubles mutants hmqR-btal- et du quadruple mutant hmqR-btal1,2,3- en comparaison avec les mutants simples (hmqR- et btal-) et la souche sauvage, en fonction de leur croissance98
Figure 27 : Visualisation de la première et de la seconde amplification PCR du 5'RACE99
Figure 28 : Longueur des 35 transcrits obtenus lors du 5'RACE comparativement au contexte génomique
Figure 29: Cinétiques de production de β-galactosidase (A) et de rhamnolipides (B) par les souches de B. thailandensis sauvages supportant les rapporteurs transcriptionnels en comparaison avec la souche sauvage portant le plasmide vide (pMCG11) et la souche sauvage sans plasmide (WT)101
Figure 30: Cinétiques de production de β-galactosidase par les souches de B. thailandensis sauvages portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ
Figure 31 : Cinétiques de production de β-galactosidase par les mutants btaR5-, hmqA-, hmqR- et hmqR- btal3- de B. thailandensis portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ, en comparaison avec la souche sauvage (WT)
Figure 32 : Cinétiques de production de β-galactosidase par les mutants polaires simples rhlA2- (en haut) et rhlA1- (en bas) de B. thailandensis portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ, par rapport à la souche sauvage (WT)106

Figure 33: Croissance (A) et cinétiques de production de Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub> (B) par B. thailandensis E264 dans un milieu NB + 4% glycérol initialement supplémenté de rhamnolipides Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub> (de 0 à 410 ppm) en fonction du temps
Figure 34: Électrophorèse sur gel acrylamide 12% des molécules récupérées après pull-down par le régions promotrices entières (I : prhlA1, II : prhlA2) ou écourtées (I <sub>541</sub> : prhlA1 <sub>541</sub> , I <sub>353</sub> : prhlA1 <sub>353</sub> )110
Figure 35 : Cinétiques de production de β-galactosidase par les systèmes hétérologues chez E. coli SM10         λpir, en milieu TSB       113
Figure 36 : Criblage dans le temps des transposants de B. thailandensis pII-lacZ sur gélose LB contenan de la trimétoprime, de la kanamycine, de la gentamycine et du Xgal113
Figure 37 : Distribution des transposants dans les différentes catégories suite à l'analyse des profils de dosage de la β-galactosidase
Figure 38: Exemple de l'activité du rapporteur transcriptionnel pll-lacZ chez un transposant appartenan à la catégorie « Nuls »
Figure 39 : Exemples d'activité des rapporteurs transcriptionnels pI-lacZ et pII-lacZ chez les transposants qui font partie de la catégorie « Clairs »
Figure 40 : Exemples d'activité des rapporteurs transcriptionnels pI-lacZ et pII-lacZ chez les transposants qui font partie de la catégorie « Foncés »
Figure 41: Schématisation des résultats combinés des analyses bioinformatiques (repliement, prédiction de promoteurs) ainsi que des résultats du 5'RACE pour les séquences intergéniques prhIA1 et prhIA2 de B. thailandensis
Figure 42 : Principe du 5'RLM-RACE adapté aux procaryotes132
Figure 43: Résumé des résultats obtenus pour les mutants hmqA- et hmqR- de B. thailandensis, er termes de transcription des opérons rhl et de production totale de rhamnolipides134
Figure 44 : Schématisation de la régulation croisée des opérons chez B. thailandensis et chez les mutants polaires rhlA1- et rhlA2141
Figure 45: Schématisation du complexe EmrAB d'E. coli et des gènes codant homologues chez B thailandensis
Figure 46: Graphique résumant les vitesses de production de rhamnolipides en fonction des vitesses de croissance pour des cinétiques réalisées avec B. thailandensis (souche sauvage = WT) et quelques uns des mutants de cette souche
Figure 47: Croissance et production de dirhamnolipides totaux de B. thailandensis E264 en milieu NB 4

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications
Tableau 2:       Les surfactants d'origine microbienne : origine, propriétés et classification de quelque exemples
Tableau 3 : Les différents congénères de rhamnolipides déjà rapportés dans la littérature
Tableau 4 : Espèces de Burkholderia communément associées aux infections humaines
Tableau 5 :       Les proportions relatives des différents rhamnolipides produits par B. thailandensis et P         aeruginosa
Tableau 6 :         Résumé des composantes de quelques systèmes de QS chez différentes bactéries42
Tableau 7 : Résumé des gènes du QS et des AHL produites chez différentes espèces de Bcc45
Tableau 8 : Liste des souches et des mutants utilisés dans cette étude
Tableau 9 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude55
Tableau 10 :       Concentrations finales d'antibiotiques et de X-gal ajoutées aux cultures liquides ou aux géloses pour E. coli et B. thailandensis, lorsque nécessaire       56
Tableau 11: Ions pseudomoléculaires correspondant aux principaux congénères de rhamnolipides retrouvés chez B. thailandensis et P. aeruginosa59
Tableau 12 : Couples « ADN-protéines » testés durant l'expérience de pull-down77
Tableau 13 :       Récapitulatif des correspondances rencontrées lors du BLASTn de prhlA1 et prhlA2 de B.         thailandensis sur le site de NCBI       88
Tableau 14: Représentations schématiques des promoteurs prédits pour prhlA1 par les logiciels NNPP, PPP, BPROM et Virtual Footprint92
Tableau 15: Représentations schématiques des promoteurs prédits pour prhlA2 par les logiciels NNPP, PPP, BPROM et Virtual Footprint93
Tableau 16 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Nuls »
Tableau 17 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Clairs »
Tableau 18 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Foncés »

### LISTE DES ABRÉVIATIONS

5'RACE Rapid amplification of cDNA ends

5'RLM RACE RNA Ligase Mediated - RACE

3-OH-C<sub>8</sub>-HSL *N*-3-hydroxy-octanoyl-HSL 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL *N*-3-hydroxy-décanoyl-HSL

3-OH-C<sub>14</sub>-HSL N-3-hydroxy-tetradécanoyl-HSL

3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL *N*-3-oxo-hexanoyl-HSL
3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL *N*-3-oxo-octanoyl-HSL
3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL *N*-3-oxo-décanoyl-HSL
3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL *N*-3-oxo-dodécanoyl-HSL

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNc Acide désoxyribonucléique complémentaire

AHL Acyl homosérine lactone

Al Auto-inducteur

ARN Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messager

Bcc Burkholderia Cepacia Complex

 $C_4$ -HSL N-butyroyl-HSL  $C_6$ -HSL N-hexanoyl-HSL  $C_7$ -HSL N-heptanoyl-HSL  $C_8$ -HSL N-octanoyl-HSL  $C_{10}$ -HSL N-décanoyl-HSL  $C_{12}$ -HSL N-dodécanoyl-HSL

CL/SM Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CLHP Chromatographie liquide à haute performance

CMC Concentration micellaire critique

DO Densité optique FK Fibrose kystique

FRR Facteur de réponse relatif

HAA Acide-3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alacanoïque

HA-ACP b-hydroxyacyl-ACP

HAQ 4-hydroxy-2-alkylquinoline

HHQ 4-hydroxy-2-heptylquinoline

HHQ-D<sub>4</sub> 4-hydroxy-2-heptylquinoline tetradeutéré

HMAQ 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinoline

HSL Homosérine lactone

LB Lysogeny Broth

NB Nutrient Broth

O/N Overnight

ONPG o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside

POE Polyoxyéthylène

PQS 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, *Pseudomonas quinolone signal* 

QS Quorum Sensing

Rha Rhamnose

SDS Dodécylsulfate de sodium

SM Spectrométrie de masse

TSB Tryptic soy broth

UFC Unités formatrices de colonies

UM Unités Miller

WT Wild type

Δ Delta

α Alpha

β Beta

γ Gamma

λ Lambda

σ Sigma

### INTRODUCTION

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles produites par une grande diversité de bactéries (Desai et Banat, 1997; Vater et al., 2002). Avec les considérations écologiques actuelles, ces composés représentent, en principe, une alternative efficace, biodégradable et non toxique face aux surfactants synthétiques produits industriellement et qui dominent aujourd'hui un marché mondial en plein essor (Intelligence, 2008; Research, 2012). Les biosurfactants sont notamment très prometteurs dans les procédés de biorestauration des sols contaminés (Desai et Banat, 1997).

Les rhamnolipides sont des biosurfactants de type glycolipidiques car ils sont constitués de molécules de rhamnoses couplées à des chaînes d'acides gras. Depuis la découverte de leur structure et de leurs propriétés physico-chimiques en 1949, ces molécules ont été largement étudiées, spécialement chez le principal producteur alors connu, Pseudomonas aeruginosa (Bergström et al., 1946; Edwards et Hayashi, 1965; Jarvis et Johnson, 1949). Cette bactérie ubiquitaire à Gram négatif est un pathogène opportuniste infectant généralement des patients immunodéprimés (Floret et al., 2009; Kominos et al., 1972; Van Delden et Iglewski, 1998). La voie de biosynthèse des rhamnolipides ainsi que les gènes codant pour les enzymes nécessaires (rhlA, rhlB et rhlC) ont également été découverts chez ce microorganisme (Abdel-Mawgoud et al., 2010). De la même façon, la plupart des études portant sur les systèmes de régulation, les conditions optimales de production de rhamnolipides ainsi que sur les méthodes de détection ou d'extraction spécifiques ont été mises au point chez P. aeruginosa. Les rhamnolipides semblent avoir, pour l'organisme producteur, une grande variété de rôles allant du facteur de virulence à l'antimicrobien, en passant par une implication certaine dans les processus multicellulaires comme la motilité de type swarming et le développement de biofilm (Davey et al., 2003; Déziel et al., 2003; Espinosa-Urgel, 2003; Köhler et al., 2000; Tremblay et al., 2007). Ces processus sont rendus possibles grâce à l'activation ou la répression coordonnée de gènes. Une telle coordina ion repose sur un système de communication bactérien très élaboré appelé quorum sensing (QS) qui fonctionne sur le principe de la sécrétion et la détection de molécules de signalisation. Les récepteurs activés vont réguler toute une batterie de gènes incluant, chez P. aeruginosa, ceux nécessaires pour la synthèse des rhamnolipides (Ochsner et al., 1994b).

Pendant longtemps, les études dans le domaine n'ont porté que chez P. aeruginosa, mais plusieurs autres  $\gamma$ -protéobactéries et  $\beta$ -protéobactéries, entre autres, ont démontré leur capacité à produire ce type de biosurfactant (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Plus précisément, certaines espèces du

genre Burkholderia, telles B. pseudomallei et B. thailandensis, ont été étudiées pour leur aptitude à générer, tout comme P. aeruginosa, différents congénères de rhamnolipides (Dubeau et al., 2009; Häussler et al., 1998). Ces deux espèces du genre Burkholderia sont génétiquement très proches à la différence près que la première est un pathogène responsable de la mélioïdose alors que la deuxième a été classée avirulente (Brett et al., 1998; Haraga et al., 2008; Yabuuchi et al., 2000). Leur haut niveau de similarité génétique fait de B. thailandensis un modèle de plus en plus utilisé pour comprendre, analyser et déjouer la virulence de B. pseudomallei (Harley et al., 1998; Kespichayawattana et al., 2004; Kim et al., 2005; Reckseidler et al., 2001). Malgré sa non-pathogénicité, B. thailandensis produit une grande diversité de rhamnolipides (Dubeau et al., 2009). C'est une des rares espèces à posséder cette caractéristique et c'est la raison pour laquelle son potentiel industriel a été étudié.

Le projet de maîtrise rapporté dans ce mémoire a été mis en place afin de répondre à une problématique assez large : comment est régulée la production de rhamnolipides chez B. thailandensis ?

En 2009, une étude a révélé que *B. thailandensis*, contrairement à *P. aeruginosa*, possède deux opérons paralogues pour la production de rhamnolipides, chacun contenant entre autres les trois gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* (Dubeau *et al.*, 2009). Malgré l'exacte similarité des séquences des deux opérons, Dubeau *et al.* ont découvert, grâce à des mutants polaires simples *rhlA*-, que le deuxième opéron semblait contribuer trois fois plus à la production de rhamnolipides que le premier. L'hypothèse à investiguer était donc l'éventuelle différence de transcription des régions promotrices de chacun des deux opérons.

De plus, il a été observé que l'addition des productions individuelles de rhamnolipides par les mutants simples *rhlA*- n'égalait pas celle de la souche sauvage. Cela suggérait qu'une stimulation croisée passant par des signaux intracellulaires devait exister entre les deux opérons.

En parallèle, un régulateur transcriptionnel de type LysR (HmqR) a été identifié comme ayant un rôle majeur dans la régulation de la production de rhamnolipides. En effet, un mutant polaire pour ce régulateur surproduit des rhamnolipides de façon importante (Audrée Lachance, 2010, résultats non-publiés). HmqR avait pourtant été repéré lors de recherches visant à identifier un régulateur d'un autre opéron de *B. thailandensis*, hmqABCDEFG, suspecté d'appartenir à un nouveau système de QS chez cette bactérie (Dumais, 2010). Il a donc été supposé qu'en plus de HmqR, le QS de *B. thailandensis*, par homologie avec *P. aeruginosa*, devait naturellement réguler la production des rhamnolipides.

Afin de répondre à la problématique et de vérifier les hypothèses évoquées ci-dessus, cinq axes de recherche ont été suivis. Tout d'abord, [1] l'analyse bioinformatique et comparative des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*, ainsi que des séquences promotrices de chaque opéron a été réalisée. En parallèle, [2] l'étude des profils de production de rhamnolipides de plusieurs mutants du QS (simples et multiples) de *B. thailandensis* a été menée. Après la création de rapporteurs transcriptionnels de type fusion-*lacZ* pour chaque opéron, les constructions ont été transférées dans la souche sauvage et dans plusieurs des mutants déjà étudiés pour faire [3] le suivi cinétique de la production de β-galactosidase et donc vérifier l'implication de chaque opéron dans la production totale de rhamnolipides. Les deux derniers axes de recherche ont été élaborés afin de tenter de découvrir les régulateurs plus ou moins directs de chaque opéron : [4] par mutagénèse aléatoire par transposon sur les rapporteurs transférés dans la souche sauvage, et [5] par *pull-down* grâce aux régions promotrices fixées sur des billes magnétiques.

Chapitre I : REVUE DE LITTÉRATURE

### I.1. LES SURFACTANTS

À l'origine, le terme anglais « surfactant » (abréviation de « surface active agent ») désignait de façon assez floue n'importe quelle substance présentant des activités de surface ou interfaciale (Salager, 2002). En 1970, Donald Small affina la définition en parlant de molécules solubles dans l'eau, amphiphiles, et ayant des propriétés tensioactives, c'est-à-dire qui modifient la tension de surface ou interfaciale (Small, 1970). En réalité, cette dernière propriété fondamentale des surfactants repose directement sur leur structure amphiphile (Mehta et al., 2010).

Copié directement de l'anglais au français, le mot « surfactant » est maintenant aussi répandu que ses synonymes, « agent de surface » ou « tensioactif ».

### I.1.1. Propriétés amphiphiles des surfactants

Le mot « amphiphile » a été inventé par Paul Winsor il y a près de 60 ans. Il est né du grec où le préfixe « amphi » signifie « double », tandis que « philos » exprime l'affinité. Ainsi, une substance amphiphile présente une double affinité qui se traduit, d'un point de vue physico-chimique, par une dualité polaire-apolaire. La partie polaire (ou hydrophile) de la molécule possède une forte affinité pour les solvants polaires, en particulier pour l'eau. À l'inverse, la partie apolaire est appelée « partie hydrophobe » ou « lipophile » pour son affinité envers les solvants organiques (Salager, 2002). Plus spécifiquement, en ce qui a trait aux surfactants, l'extrémité apolaire est normalement composée d'une ou plusieurs chaînes 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).

À cause de sa dualité, un composé amphiphile n'est « à l'aise » dans aucun solvant, qu'il soit polaire ou apolaire, car il y a toujours une des deux parties de la molécule qui « n'aime pas » son environnement. Pour cette raison, les surfactants et autres molécules amphiphiles ont une forte tendance à migrer vers n'importe quelle surface (limite entre une phase condensée et une phase gazeuse) ou interface (limite entre deux phases condensées). Cela leur permet d'orienter leur groupement polaire vers un milieu aqueux, et leur groupement apolaire hors de l'eau (vers l'air ou l'huile éventuellement) (Salager, 2002).

Cependant, il serait incorrect de croire que la totalité des molécules amphiphiles présente cette particularité. En effet, seuls les composés possédant des propriétés polaires et apolaires relativement

équilibrées (comme les surfactants) tendent à migrer aux interfaces où ils vont jouer un rôle dans la tension superficielle et interfaciale (Salager, 2002).

### I.1.2. Tension superficielle et tension interfaciale

Appelée « tension de surface », « énergie d'interface » ou bien encore « énergie de surface », la tension superficielle est une force qui existe au niveau de toute surface (limite entre une phase condensée et une phase gazeuse). À l'inverse, la tension entre deux phases condensées (solides ou liquides) est généralement appelée « la tension interfaciale » (Boussey Boussey-Control, 2008). De façon concrète, c'est grâce à cette tension que certains insectes peuvent marcher sur l'eau, qu'un objet léger peut se maintenir à la surface d'un liquide, ou encore qu'une goutte de rosée ne s'étale pas sur un pétale de fleur. La tension superficielle explique aussi la formation de bulles de savon et la coalescence des gouttes ou des bulles.

L'unité de mesure de la tension superficielle est le Newton par mètre (N·m<sup>-1</sup>) qui est équivalent aux joules par mètre carré (J·m<sup>-2</sup>). Il s'agit donc d'une force ou d'une énergie qu'il faut appliquer à un liquide pour provoquer l'extension de sa surface (Boussey-Control, 2008; Rosen, 1978). En d'autres termes, plus la tension superficielle est haute, plus il faut mettre de force pour briser la surface.

Chaque interface spécifique, dans des conditions données, possède sa propre valeur de tension superficielle. Par exemple, celle de l'interface air/eau est de 72 mN·m<sup>-1</sup> à 25°C. Mais cette valeur peut varier de 75,6 à 58,8 mN·m<sup>-1</sup> selon la température (de 0 à 100°C) ou encore grâce à la présence de certains composés comme les surfactants (Speight et Lange, 2005).

# I.1.3. Concentration micellaire critique (CMC) et propriétés tensioactives des surfactants

C'est l'antagonisme de la structure amphiphile d'un tensioactif qui lui confère ses propriétés particulières (Neto, 2007). En effet, du fait qu'il migre aux interfaces (air/eau ou huile/eau), le surfactant sert de liant naturel entre les deux milieux. Son efficacité est donc évaluée par sa capacité à abaisser la tension superficielle ou interfaciale (Rosen, 1978). Par exemple, un bon surfactant peut faire passer l'énergie de surface de l'eau de 72 à 29 mN·m<sup>-1</sup>, et la tension interfaciale eau/n-hexadécane de 40 à 1 mN·m<sup>-1</sup> (Mulligan, 2009; Mulligan et Gibbs, 2004; Vater et al., 2002). La tension de surface est corrélée à la concentration en surfactant jusqu'à la concentration micellaire critique (CMC) (cf. Figure 1).

La CMC est définie spécifiquement pour chaque surfactant et traduit sa solubilité, c'est-à-dire la concentration minimale nécessaire à la formation de micelles (Becher, 1965). En effet, lorsque la CMC est atteinte, cela signifie que l'interface est saturée en surfactants ce qui entraine la formation de certaines structures secondaires (micelles, doubles couches, vésicules). À partir de ce point, la valeur de la tension de surface ou interfaciale atteint un minimum (Lin, 1996). De ce fait, plus la valeur de CMC d'un surfactant est basse, plus celui-ci est efficace puisqu'une concentration moindre est nécessaire pour abaisser la tension de surface (Becher, 1965).

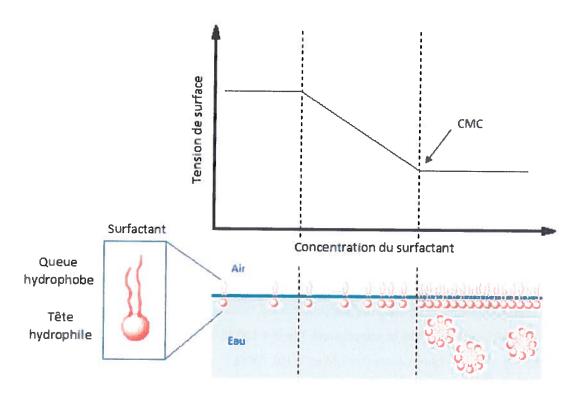


Figure 1 : Schématisation de la corrélation entre la concentration en surfactant et l'abaissement de la tension de surface jusqu'à la CMC. Tiré de Dubeau (2009).

Cependant, la valeur de la CMC peut varier selon certains paramètres tels que le pH, la température et la force ionique (Mulligan et Gibbs, 2004; Murata et al., 1997; Pandit et Strykowski, 1989; Sugihara et al., 1982; Tokiwa et Ohki, 1968). Par exemple, la CMC du dodécylsulphate de sodium (SDS) décroît avec le pH mais reste constante à pH élevé (Rahman et Brown, 1983). En ce qui a trait aux biosurfactants, la longueur de la chaîne alkyle qui le constitue est un facteur très important. Des recherches sur la CMC de dérivés de sophorolipides ont clairement démontré que plus la chaîne

comprenait de carbones, plus l'hydrophobicité augmentait, facilitant dès lors la formation de micelles (Zhang *et al.*, 2004).

#### I.1.4. Classification des surfactants

La classification la plus répandue et la plus scientifique des tensioactifs est basée sur leurs propriétés de dissociation dans l'eau. Ainsi, ils peuvent se regrouper en quatre grandes catégories selon la nature de leur pôle hydrophile : les tensioactifs anioniques chargés négativement, les cationiques chargés positivement, les zwitterioniques possédant à la fois une charge positive et négative, et les non ioniques, non chargés (Host et Rocher, 2001; Mulligan et Gibbs, 2004; Neto, 2007).

### I.1.4.1. Les tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques représentaient, il y a encore une dizaine d'années, la classe la plus importante et la plus largement utilisée (Host et Rocher, 2001). Dans l'eau, ils se dissocient en un anion amphiphile et un cation, qui est généralement un métal alcalin (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ou un ammonium quaternaire. Les savons, les alkylbenzènes sulphonates ou encore les sulfates d'alcool gras appartiennent à cette catégorie (Host et Rocher, 2001). Un des plus connus est probablement le SDS (Mulligan et Gibbs, 2004; Neto, 2007).

### I.1.4.2. Les tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques se dissocient dans l'eau en un cation amphiphile et un anion, la plupart du temps de type halogène. Cette catégorie regroupe entre autres les sels d'ammonium quaternaires triméthylés et les sels de pyridinium.

### I.1.4.3. Les tensioactifs zwitterioniques

Les tensioactifs zwitterioniques, ou amphotères, peuvent présenter aussi bien une dissociation anionique que cationique. C'est par exemple le cas de produits synthétiques comme les bétaïnes, les sulfobétaïnes, ou des substances naturelles comme les aminoacides et les phospholipides. En effet, du fait que la partie hydrophile comprenne à la fois une charge positive et négative, ce type de surfactant peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution dans laquelle il est solubilisé. Cependant, certains d'entre eux peuvent rester insensibles au pH.

### I.1.4.4. Les tensioactifs non ioniques

Les tensioactifs non ioniques ne s'ionisent pas en solution aqueuse car leur groupement hydrophile est indissociable (alcool, phenol, ether, ester, ou amide). Pour cette raison, ils étaient relativement peu efficaces et donc peu recherchés il y a plusieurs années, avant l'apparition du procédé d'éthoxylation. En effet, grâce à l'essor de la chimie organique d'après-guerre, ce procédé a été industrialisé. Il permet d'accroître la solubilité de nombreux produits, dont les surfactants non ioniques, en polymérisant l'oxyde d'éthylène (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) pour former une chaîne hydrophile, le polyoxyéthylène (POE). Ces POE sont ajoutés à des alcools ou des phénols pour produire de puissants tensioactifs créés sur mesure. Ainsi élaborés industriellement, les éthoxylats dominent aujourd'hui le groupe des surfactants non ioniques, qui eux-mêmes dominent le marché mondial des tensioactifs. L'exemple le plus utilisé en microbiologie est probablement le Tween ou ester de Sorbitan.

Au cours des dernières décennies, les surfactants non ioniques constitués de glucosides (tête hydrophile, dérivés du glucose) ont été introduits sur le marché du fait de leur faible toxicité. Naturellement présents chez les plantes, les glucosides sont recréés via des procédés d'estérification d'acides gras par des polyalcools naturels ou des polyéthylènes glycols. Ainsi, certains esters sont obtenus à partir de glycérols ou de dérivés glucidiques issus de matières premières naturelles et renouvelables (glucides, huiles).

#### 1.1.5. Domaines d'application des tensioactifs et marché mondial

D'un point de vue commercial, les tensioactifs sont souvent regroupés selon leur usage. Pourtant, de nombreux surfactants possèdent plusieurs fonctions possibles (Salager, 2002). Ainsi, les tensioactifs sont utilisés comme détergents, agents de solubilisation, agents moussants, agents mouillants, agents dispersants, émulsifiants, etc. Le Tableau 1 résume les quatre grandes familles de tensioactifs, leur nature chimique ainsi que leurs principales applications industrielles. Ils sont retrouvés aussi bien en détergence ménagère qu'industrielle, en passant par le marché des industries techniques et agricoles, ou encore l'hygiène corporelle et la cosmétique (cf. Figure 2) (Host et Rocher, 2001).

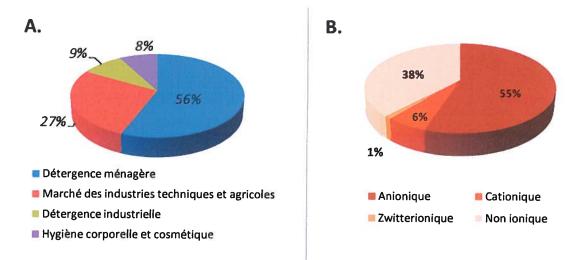


Figure 2: Production mondiale de surfactants en 2001 par applications (A) et par groupe de surfactants (B). (Host et Rocher, 2001)

En termes de production, le marché des tensioactifs ne cesse de prendre de l'ampleur. En 1995, 9,3 millions de tonnes étaient délivrées dans le monde (Patel *et al.*, 1999; Ward, 1996). Les industriels planifiaient alors une croissance à court terme de 3-4 % par année, ce qui correspondait à une estimation de la production de 10,8 et 12,5 millions de tonnes en 2000 et 2005 respectivement (*cf.* Figure 3). En 2002, le bilan mondial révèle des productions plus importantes que prévues et les estimations ont été réévaluées à 18,2 millions de tonnes pour 2003 (Brackmann et Hager, 2004; Host et Rocher, 2001). Mais la récession économique globale de 2005-2008, causée par la crise financière, a eu un impact sur la croissance des industries chimiques, et ce malgré le bas prix des matières premières. Ainsi, en 2009, le marché mondial des tensioactifs ne connaît qu'une légère croissance de 2% par rapport à l'année précédente et représente 24,33 milliards de dollars (US \$). Cependant, les prévisions de croissance sont maintenues et attendues autour de 2,8% par année jusqu'en 2012, puis 3,5-4% dans les années suivantes (Intelligence, 2008).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications. Tiré de Neto (2007)

	Famille de tensioactifs	Principales caractéristiques	Exemples d'utilisation
	Savons		Détergent
ANIONIQUES	Alkylsulfates	<ul> <li>Les plus courants</li> <li>Peu onéreux</li> <li>N'irritent pas la peau</li> <li>Bonne biodégradabilité</li> </ul>	Agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)
	Alkylbenzènes sulfonate linéaires (LAS)	boiline blodegradabilite	Agent émulsifiant, dispersant et détergent
CATIONIQUES	Ammoniums quaternaires	Charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	Agent antistatique et adoucissant (produits de rinçage linge et cheveux)  Bactéricide (désinfectants chirurgicaux, antiseptiques)
ZWITTERIONIQUES	Alkylbétaïnes	Peu agressifs pour les     tissus vivants     Compatibles avec toutes	Adoucissant pour textile et cheveux
	Alkylsulfobétaïnes		
ZWITT	Dérivés d'acides aminés	les autres classes de tensioactifs	Additif inhibiteur de corrosion
	Alcools éthoxylés et Alkylphénols éthoxylés	Peu biodégradables	Détergent, dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge)
NON IONIQUES	Alkylpolyglycosides (APG)	<ul> <li>Très bas niveau de toxicité</li> <li>Insensible au pH</li> <li>Non irritant</li> <li>Bonne synergie avec les</li> </ul>	Agent moussant dans l'agrochimie Co-tensioactif en détergence Soins corporels
	Alkylglucamides		Formulation pour shampooing et gel douche
	Esters de glycérol et Esters d'hexitols	autres tensioactifs	Agent émulsifiant dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique

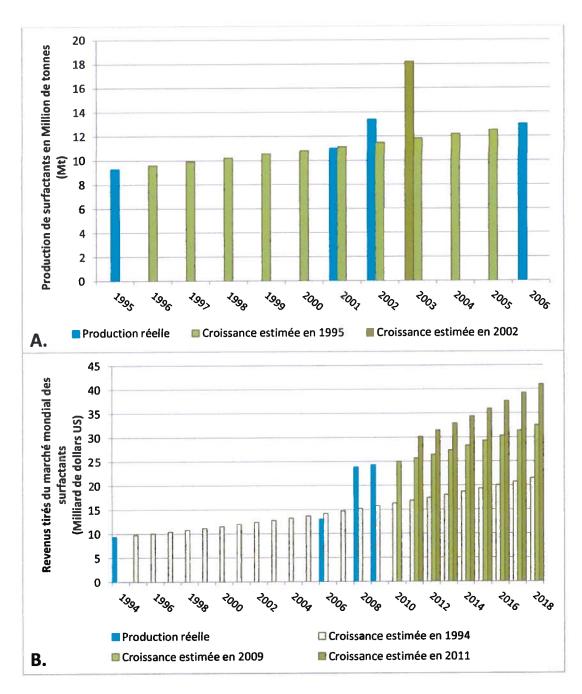


Figure 3: Les évolutions réelles et estimées du marché mondial des surfactants en termes de millions de tonnes produits (A) et en termes de revenus générés (B). (Brackmann et Hager, 2004; Desai et Banat, 1997; Host et Rocher, 2001; Intelligence, 2008; Levinson, 2009; Patel et al., 1999; Research, 2012)

Finalement, les derniers rapports effectués révèlent des résultats encore meilleurs que prévus car les revenus générés par le marché des surfactants pourraient atteindre plus de 41 milliards de dollars

pour 2018, ce qui se traduirait par une croissance annuelle autour de 4,5% (Research, 2012). L'arrivée sur le marché de nouveaux producteurs et demandeurs à grandement influencé l'essor du marché mondial des surfactants ces dernières années. La région Asie-Pacifique domine déjà le marché devant l'Amérique du Nord et l'Europe de l'ouest, avec près de 37% de la consommation globale. Mais l'Amérique du Sud, notamment par la production et la consommation massive du Brésil, devrait connaître une solide croissance (Research, 2012).

Pendant longtemps, les tensioactifs anioniques ont dominé le marché (cf. Figure 2). Mais le développement de nouveaux surfactants, comme les agro-tensioactifs (une partie du surfactant est d'origine végétale), a induit un tournant majeur au début du XXIème siècle (Intelligence, 2008; Vandeputte, 2009). En effet, par soucis écologique, les tensioactifs non ioniques, jouissant d'une très bonne image (faible toxicité, meilleure biodégradabilité, agressivité moindre pour la peau), occupent désormais la première place et sont pressentis pour connaître la plus grosse croissance d'ici à 2018. Associés aux tensioactifs anioniques, ils représentent aujourd'hui près de 85% de la demande globale (Intelligence, 2008; Research, 2012; Vandeputte, 2009). Dans cet esprit de soucis écologique (cf. Figure 4), beaucoup de recherches s'orientent vers les biosurfactants.

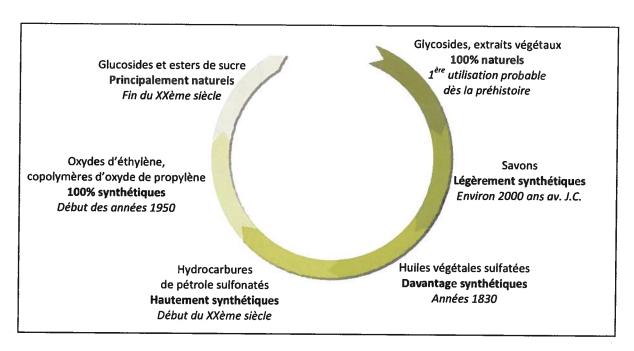


Figure 4 : Cycle des surfactants naturels et synthétiques dans l'histoire. Tiré de Hargreaves (2003)

#### I.1.6. Les biosurfactants

Les biosurfactants représentent une sous-classe spécifique des tensioactifs et désignent tout un groupe de molécules structurellement variées synthétisées par des microorganismes (Desai et Banat, 1997; Vater et al., 2002). En effet, des bactéries, certaines levures, voire quelques mycètes sont capables de produire des surfactants reconnus pour posséder des propriétés semblables aux agents de surface synthétiques à la différence près qu'ils sont plus efficaces, spécifiques, écologiques, et stables que plusieurs surfactants artificiels (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Desai et Banat, 1997; Georgiou et al., 1992; Lin, 1996; Mulligan, 2009; Soberon-Chavez, 2011).

### I.1.6.1. Types de biosurfactants

Les biosurfactants sont produits à partir de divers substrats tels que, entre autres, les sucres, les huiles et les alcanes (Lin, 1996). Ils incluent ainsi une grande variété de structures chimiques qui se répartissent selon cinq groupes principaux (cf. Tableau 2) : (1) les glycolipides, (2) les lipopeptides et les lipoprotéines, (3) les acides gras, les lipides neutres et les phospholipides, (4) les surfactants polymériques, et (5) les biosurfactants particulaires (Desai et Banat, 1997; Georgiou et al., 1992; Mulligan et Gibbs, 2004; Vater et al., 2002). La plupart de ces composés sont soit anioniques, soit neutres. Seuls quelques uns sont cationiques comme ceux comprenant des groupements amines (Mulligan et Gibbs, 2004).

La catégorie des glycolipides regroupe les surfactants microbiens les plus répandus et les plus documentés où des hydrates de carbone sont attachés à de longues chaînes d'acide gras aliphatique (Georgiou et al., 1992). Les rhamnolipides sont inclus dans ce groupe.

#### I.1.6.2. L'avenir commercial des biosurfactants

La plupart des surfactants utilisés de nos jours sont chimiquement synthétisés (Soberon-Chavez, 2011). Ces tensioactifs synthétiques sont produits à partir de dérivés du pétrole (par ex. alcools, alkylbenzènes, alkylphénols) ou de matériaux naturels bruts (huiles et graisse d'origine végétale et animale, acides gras et alcools, carbohydrates, etc.) auxquels sont appliqués divers procédés chimiques (Prommachan, 2002).

Cependant, au cours des dernières années, une attention particulière a été apportée envers les biosurfactants du fait de leur large spectre de propriétés fonctionnelles et des diverses capacités de

Tableau 2 : Les surfactants d'origine microbienne : origine, propriétés et classification de quelques exemples. Adapté de Desai et Banat (1997)

Références	(Dubeau <i>et al.</i> , 2009; Hisatsuka <i>et al.</i> , 1971; Parra <i>et al.</i> , 1989; Reiling <i>et al.</i> , 1986)	(Lang et Philp, 1998; Margaritis <i>et al.</i> , 1979; Rapp <i>et al.</i> , 1979)	(Cooper et Paddock, 1983; Gobbert <i>et al.</i> , 1984; Hommel <i>et al.</i> , 1987; Van Bogaert <i>et al.</i> , 2007)	(Boothroyd <i>et al.,</i> 1956; Hewald <i>et al.,</i> 2005)	(Matsuyama <i>et al.</i> , 1992)	(Laycock <i>et al.,</i> 1991; Neu <i>et al.,</i> 1990)	
Certains microorganismes	Pseudomonas sp. P. aeruginosa* B. pseudomallei* B. thailandensis*	Rhodococcus sp. R. erythropolis* N. erythropolis* Arthrobacter sp. Mycobacterium sp.	T. bombicola* T. apicola* T. petrophilum* C. batistae*	U. zeae* U. maydis*	S. marcescens*	P. fluorescens* P. libanensís*	
Tension interfaciale (mN·m <sup>-1</sup> )	1 0,25 ¤	14 – 17 3,5 ¤ 15	1,8 0,9 ¤ ¤	пп	хх	αα	
CMC (µg·ml <sup>-1</sup> )	0,1-10	4 20 × × × × × × × × × × × × × × × × × ×	nnn	пп	×	150 ¤	
Tension de surface (mN·m <sup>-1</sup> )	25 – 30 29 ¤	32 – 36 30 %	33 33	x x	28 - 33	26,5 ¤	
Exemple de structure		R-6-0 НО НО Н	HO CH <sub>3</sub> HO CH <sub>3</sub> HO CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>1</sub> (CH <sub>2</sub> ) HO O CH <sub>3</sub> HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O	HO O HO O HO O O O O O O O O O O O O O		
Biosurfactants	Rhamnolipides	Tréhalolipides	Sophorolipides	Cellobiolipides	Serratamolides	Viscosines	
Groupes	1	səpidilo		The state of the s	Lipopeptides et lipo		

(Bernheimer et Avigad, 1970; Seydlova et Svobodova, 2008)	(Javaheri <i>et al.</i> , 1985; Yakimov <i>et al.</i> , 1995)	(Cooper et al., 1981; Cooper et al., 1979)	(Kretschmer <i>et al.</i> , 1982; Macdonald <i>et al.</i> , 1981)	(Beebe et Umbreit, 1971; Knickerbocker <i>et al.</i> , 2000)	(Cirigliano et Carman, 1984; Cirigliano et Carman, 1985)	(Persson <i>et al.</i> , 1988; Singh et Desai, 1989)	(Rosenberg et Ron, 1999; Rosenberg <i>et al.</i> , 1979)	(Barkay et al., 1999; Navon-Venezia et al.,	(Käppeli et Finnerty, 1979)	(Fattom et Shilo, 1985; Rosenberg et Ron, 1999)
B. subtilis ** B. pumilus A **	B. licheniformis**	C. lepus**	N. erythropolis*	T. thiooxidans**	C. lipolytica*	P. fluorescens* D. polymorphus*	A. calcoaceticus*	A. radioresistens*	A. calcoaceticus*	Grande variété de bactéries
<b>←</b>	0,1-0,3	2	m	xx	¤	n n	χx	x	¤	m
23 – 160 ¤	12 – 20	150	x	×	¤	10	xx	200	¤	×
27 – 32 ¤	27	30	32	200	¤	27 ¤	x	41	×	x
		ноос	ÇII;-O-CO-R ÇII-O-CO-R CH;-O-CO-R		**************************************	ж	H2COCO HO OF OF H2COCO HO OF OF H2COCO	п	ж	ulaires Cellules entières
Surfactines	Lipides- peptides	Acides gras	Lipides neutres	Phospholipides	Liposan	« Carbohydrate -protein-lipid »	Emulsan	Alasan	_ <u>a</u>	s Cellules entières
Lipopeptides et lipoprotéines (suite)		səpidilordsord		Surfactants polymériques			Biosurfactants	particulaires		

\* A. = Acinetobacter; B. = Burkholderia; C. = Candida; D. = Debaryomyces; N. = Nocardia; P. = Pseudomonas; R. = Rhodoccocus; S. = Serratia; T. = Torulopsis; U. = Ustilago \*\* B. = Bacillus; C. = Corynebacterium; T. = Thiobacillus

synthèse des microorganismes. La majorité des applications des biosurfactants tourne autour des industries des cosmétiques, de l'alimentation et de l'huile, et également en tant qu'agent thérapeutique (Desai et Banat, 1997; Prommachan, 2002). Mais les secteurs les plus prometteurs à court terme sont ceux liés aux décontaminations des citernes (huile) et des déversements d'hydrocarbures, au transport de pétrole brut, à la récupération assistée du pétrole brut à partir de boues, et à la biorestauration des sites contaminés par des hydrocarbures, des métaux lourds et d'autres polluants (Desai et Banat, 1997).

Le problème majeur lié à l'industrie émergente des biosurfactants reste leur coût de production qui est de loin supérieur à celui d'une synthèse chimique. Plus précisément, il s'agit des procédés en aval de la production qui sont responsables de 60% des coûts (Desai et Banat, 1997). En effet, il existe une large gamme de méthodes d'extraction dépendamment de la charge ionique du biosurfactant, sa solubilité dans l'eau et sa localisation (intracellulaire, extracellulaire ou membrane) (Heyd et al., 2008). Mais tous ces procédés, aussi efficaces soient-ils, ne sont ni écologiques, ni envisageables à très grande échelle. Étant donné les considérations économiques, les technologies liées aux biosurfactants vont devoir améliorer soit leur rendement de production par cellule à partir du milieu de culture, soit leurs procédés d'extraction. De plus, l'efficacité des biosurfactants est probablement affectée par les autres éléments présents dans les préparations (Desai et Banat, 1997).

Le plus important étant leur profil écologique, leur efficacité et leurs spécificités, les biotechnologies axent malgré tout énormément de recherches sur les biosurfactants. Un des aspects étudiés est une meilleure compréhension des systèmes de régulation de la production des biosurfactants par les microorganismes dans le but de les contrôler et donc d'augmenter le rendement de production.

### I.2. LES RHAMNOLIPIDES

Les rhamnolipides sont des biosurfactants de la famille des glycolipides. Ils ont pour la toute première fois été identifiés lors d'une étude sur *Pseudomonas aeruginosa*, alors dénommée *P. pyocyanea* (Bergström *et al.*, 1946). Ils y étaient succinctement décrits comme étant composés d'un sucre relié à un acide gras hydroxylé. Depuis, de nombreuses études ont porté sur leur caractérisation chimique et fonctionnelle (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Chrzanowski *et al.*, 2012). Leur production chez *P. aeruginosa* sera détaillée à la section I.3.3.2.1.

### I.2.1. Structure des rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des tensioactifs de faible poids moléculaire dont la structure a réellement été étudiée pour la première fois par Jarvis et Johnson (1949), et officiellement élucidée par Edwards et Hayashi (1965). Ces derniers identifient le principal rhamnolipide produit par P. aeruginosa comme étant une molécule de  $2-O-\alpha-l$ -rhamnopyranosyl- $\alpha-l$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanoyl- $\beta$ -hydroxydécanoate.

En réalité, il existe différents congénères de rhamnolipides bien que tous rassemblent les mêmes spécificités : leur tête hydrophile est constituée de rhamnose(s) tandis que leur queue hydrophobe est constituée de chaîne(s) d'acides gras β-hydroxylée(s). La liaison entre la tête et la queue se fait par la terminaison carboxylique de la chaîne d'acide gras. Il existe deux groupes majeurs de rhamnolipides : les mono et les di-rhamnolipides. Les mono-rhamnolipides ne comportent qu'un seul rhamnose tandis que les di-rhamnolipides en comprennent deux. Par ailleurs, le nombre de chaînes d'acides gras ainsi que leur longueur peut varier (cf. Tableau 3).

Pour simplifier l'écriture chimique des rhamnolipides, les rhamnoses sont souvent symbolisés par le diminutif « Rha » tandis que les chaînes d'acide gras et leur longueur (en nombre de carbones : n) sont identifiées par « C<sub>n</sub> ». Il est également possible que les acides gras soient insaturés et sont alors caractérisés par « C<sub>n:x</sub> », avec « x » indiquant le nombre d'insaturations. Ainsi, le principal congénère produit par *P. aeruginosa* se symbolise par Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, bien que ce micro-organisme produise également d'autres congénères en moindre quantités (cf. Tableau 5, section I.3.3.2.1).

Tableau 3: Les différents congénères de rhamnolipides déjà rapportés dans la littérature. n: le nombre de carbones dans la chaîne d'acide gras considérée; x: le nombre d'insaturations dans la chaîne d'acide gras considérée. Adapté de Abdel-Mawgoud et al. (2010).

Symbole	Longueurs et insaturations des chaînes			es chaînes	Exemple de structure
Congénères mono-rh	amno-mono-lipi	diques			
Rha-C <sub>n</sub>	n : 8-10-12				Rha-C <sub>a</sub> OH
Rha-C <sub>n:x</sub>	n : 8-12-14	n:8-12-14 x:2			H <sub>3</sub> C O CH <sub>3</sub>
Congénères mono-rh	amno-di-lipidiqu	es	<u> </u>		OH OH
Rha-C <sub>n1</sub> -C <sub>n2</sub>	n1 : 8-10-12-1	T		10-12-14-16	Rha-C <sub>e</sub> -C <sub>10</sub>
Rha-C <sub>n1:x</sub> -C <sub>n2</sub>	n1 : 10-12	: 10-12 x : 1		n2 : 8-10	
Rha-C <sub>n1</sub> -C <sub>n2:x</sub>	n1 : 8-10-12	8-10-12 n2:10-12-14		x:1	HO CH <sub>3</sub>
Congénères di-rhamn	o-mono-lipidiqu	es			The second second second
Rha-Rha-C <sub>n</sub>	n : 8-10-12-14				Rha-Rha-C <sub>13</sub> OH
Rha-Rha-C <sub>12:1</sub>	n:12	n:12 x:1			H <sub>O</sub> OH
Congénères di-rhamn	o-di-lipidiques				
Rha-Rha-C <sub>n1</sub> -C <sub>n2</sub>	n1 : 8-10-12-14			10-12-14-16	Rha-Rha-C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>
Rha-Rha-C <sub>n1:x</sub> -C <sub>n2</sub>	n1 : 12	x:1		n2 : 8-10-12	H <sub>2</sub> C CH <sub>3</sub>
Rha-Rha-C <sub>n1</sub> -C <sub>n2:x</sub>	n1:8-10-12		x:1	N,C CH <sub>3</sub>	
Congénère di-rhamno-tri-lipidique					
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	n : 14			-	Rha-Rha-C <sub>11</sub> C <sub>11</sub> C <sub>11</sub>

# 1.2.2. Rôles des rhamnolipides pour les organismes producteurs

Depuis leur découverte, les rhamnolipides ont été retrouvés au centre de plusieurs projets (cf. Figure 5) et ont fait l'objet d'investigations précises sur leurs rôles exacts et leurs fonctions physiologiques dans la cellule. D'abord simplement associés aux facteurs de virulence produits par P. aeruginosa, les rhamnolipides, du fait de leurs propriétés physico-chimiques, ont révélés leur importance

dans le domaine de la biodégradation de substrats peu solubles, ouvrant ainsi la porte aux études de biorestauration des sols contaminés aux hydrocarbures (Hisatsuka *et al.*, 1971; Itoh et Suzuki, 1972; Sierra, 1960). Parallèlement, d'autres recherches rapportaient des propriétés antimicrobiennes intéressantes (Itoh *et al.*, 1971). Ce n'est que récemment que de nouveaux rôles ont été découverts avec l'étude plus approfondie de la motilité de type *swarming* des bactéries et la formation de biofilms (Davey *et al.*, 2003; Déziel *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003; Köhler *et al.*, 2000).

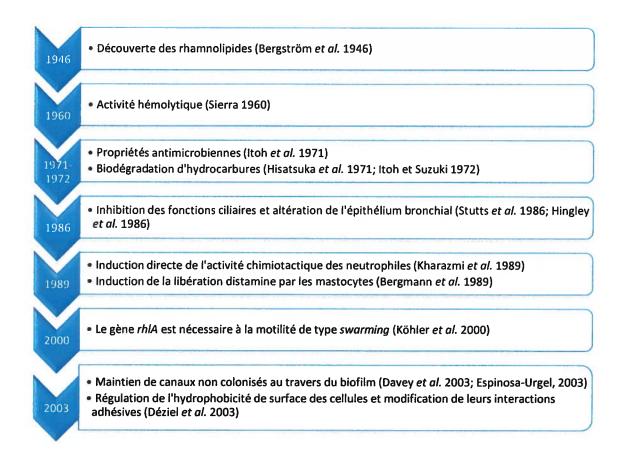


Figure 5: Chronologie des premières découvertes sur les différents rôles majeurs des rhamnolipides. Inspiré de Abdel-Mawgoud et al. (2010) et Chrzanowski et al. (2012).

La grande majorité des études sur les rôles possibles des rhamnolipides ont été menées chez *P. aeruginosa* (*cf.* section 1.3.1), mais aucune contre-indication ne suggère que ces fonctions ne soient pas également effectives chez les autres micro-organismes producteurs de rhamnolipides.

#### I.2.2.1. Facteurs de virulence

P. aeruginosa, chez qui les rhamnolipides ont été identifiés pour la première fois, est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires chroniques chez des patients immunodéprimés. Parce qu'ils ne présentent pas le profil traditionnel des facteurs de virulence de P. aeruginosa, les rhamnolipides n'y sont pas toujours associés. Pourtant plusieurs études appuient l'idée contraire.

En 1960, l'activité hémolytique thermotolérante des rhamnolipides de cette bactérie est identifiée et confirmée par plusieurs autres recherches sur les décennies suivantes (Kurioka et Liu, 1967; Sierra, 1960; Stutts et al., 1986). En 1987, des rhamnolipides sont retrouvés dans le sputum de patients gravement atteints de fibrose kystique et colonisés par *P. aeruginosa* (Kownatzki et al., 1987). Plus précisément, les biosurfactants assureraient la fixation de la bactérie sur les cellules épithéliales facilitant ainsi le développement de l'infection (Zulianello et al., 2006). De plus, les rhamnolipides sont connus pour inhiber les fonctions ciliaires de l'épithélium bronchial, et par conséquent, le transport mucociliaire (Hingley et al., 1986; Read et al., 1992; Stutts et al., 1986).

Les rhamnolipides interfèrent dans le système immunitaire de l'hôte. Par exemple, en 1989, l'équipe de Döring démontre que ces biosurfactants induisent directement l'activité chimiotactique des neutrophiles en stimulant la réponse oxydative de ces cellules (Kharazmi et al., 1989). Les rhamnolipides sont également cytolytiques pour les macrophages humains et peuvent inhiber la réponse phagocytaire (Mcclure et Schiller, 1992; Mcclure et Schiller, 1996). Des études ont par la suite démontré que les rhamnolipides causent la nécrose de leucocytes polymorphonucléaires car un mutant déficient en production de rhamnolipides perd sa capacité à se défendre contre les leucocytes (Jensen et al., 2007; Van Gennip et al., 2009). De nombreuses autres études ont porté sur l'implication des rhamnolipides dans l'altération des défenses immunitaires de l'hôte. Globalement, les rhamnolipides semblent stimuler les systèmes inflammatoires et les sécrétions d'interleukines ce qui conduit à la dégradation des tissus des poumons des patients affectés (Bédard et al., 1993; König et al., 1992). Enfin, une étude récente a démontré l'importance de la production de rhamnolipides dans l'établissement et la persistance d'infections de P. aeruginosa (Van Gennip et al., 2009).

#### I.2.2.2. Motilité de surface ou « swarming »

La motilité de type swarming a été récemment identifiée chez *P. aeruginosa* (Rashid et Kornberg, 2000). Il s'agit d'une forme rapide et coordonnée de translocation d'une population bactérienne sur une surface semi-solide, le plus généralement grâce à des dendrites qui donnent aux colonies l'aspect d'une fleur (Verstraeten *et al.*, 2008). Les cellules effectuant un *swarming* deviennent allongées et hyperflagellées, et sécrètent une matrice composée d'exopolysaccharides et de surfactants (Harshey, 2003). En effet, il est indispensable pour les cellules de conditionner la surface environnante en produisant un agent mouillant qui permet de réduire la tension de surface entourant la colonie (Matsuyama et Nakagawa, 1996).

Les rhamnolipides, par leurs propriétés physico-chimiques, interviennent largement dans ce type de motilité. Les mono-rhamnolipides servent essentiellement d'agents mouillants, tandis que les dirhamnolipides stimulent la formation des dendrites ainsi que la migration des cellules (Tremblay et al., 2007). Les di-rhamnolipides ont en fait un effet attracteur sur les cellules en mouvement. Ces études ont même démontré que, dépendamment des congénères en présence, les patrons de *swarming* diffèrent notablement (Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). Tremblay et al. (2007) ont également mis en évidence que les précurseurs des rhamnolipides, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques ou HAA (cf. section 1.3.3.2), interviennent également dans le *swarming* mais de façon opposée aux dirhamnolipides. En effet, en plus d'inhiber la formation des dendrites et la migration des cellules, ils ont un effet répulsif envers les cellules en *swarming*.

# I.2.2.3. Développement de biofilms

Il a longtemps été admis que les bactéries vivaient à l'état planctonique, mais ces dernières sont en réalité organisées en une sorte de communauté très complexe dans l'environnement : ce sont les biofilms. La formation d'un tel réseau permet une protection accrue vis-à-vis des défenses de l'hôte lors d'infections, ou vis-à-vis d'autres bactéries indésirables, mais également face aux éventuels traitements antibiotiques.

De plus en plus d'études démontrent un lien étroit entre le *swarming* et la formation des biofilms. Par exemple, un mutant dont la motilité est altérée (inhibition ou sur-activation) se retrouve le plus généralement déficient dans la formation d'un biofilm mature (Caiazza *et al.*, 2007; Harshey, 2003; Overhage *et al.*, 2007; Parkins *et al.*, 2001; Shrout *et al.*, 2006; Verstraeten *et al.*, 2008; Yeung *et al.*,

2009). Les recherches sur le sujet suggèrent que la motilité de type *swarming* est une étape cruciale dans la formation d'un biofilm. Ainsi, les rhamnolipides se retrouvent impliqués dans l'élaboration de ce réseau bactérien mais pas seulement en rendant l'environnement favorable (agent mouillant) ou en stimulant la motilité des cellules comme mentionné dans la section précédente.

Dépendamment de l'emplacement au sein du biofilm, les cellules ne sont pas toutes soumises aux mêmes conditions. En 2003, plusieurs équipes ont identifié les rhamnolipides comme étant responsables du maintien de canaux à l'intérieur du biofilm, assurant ainsi l'approvisionnement continu d'éléments nutritifs et d'oxygène à toutes les cellules (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Lequette et Greenberg (2005) ont quant à eux souligné que la modulation des gènes codant pour la production de rhamnolipides est différente selon l'emplacement des cellules au sein du biofilm.

Les rhamnolipides induisent également la sécrétion de lipopolysaccharides et sont des médiateurs des changements d'interactions adhésives, spécialement lorsque les conditions nutritionnelles se modifient (Al-Tahhan *et al.*, 2000; Boles *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Neu, 1996). Ainsi, ils jouent un rôle dans la formation de microcolonies dans les phases initiales du développement des biofilms, et aussi dans la dissémination du biofilm mature (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007).

#### I.2.2.4. Activité antimicrobienne

Dès 1971, les rhamnolipides ont été identifiés comme ayant des propriétés antimicrobiennes envers un grand nombre de bactéries, aussi bien à Gram positif que négatif (Itoh et al., 1971; Lang et al., 1989). Des effets inhibiteurs envers l'activité de certains champignons ont également été constatés (Abalos et al., 2001; Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2003). Cependant, leur mécanisme n'a pas réellement été observé in vitro ou in vivo. Les surfactants synthétiques ciblant l'enveloppe cellulaire, le mode d'action proposé pour les rhamnolipides repose sur les mêmes hypothèses : ils s'intercaleraient dans la membrane et causeraient la destruction cellulaire par leurs effets perméabilisant (Sotirova et al., 2008).

#### I.2.2.5. Biodégradation d'hydrocarbures

Les rhamnolipides étant des surfactants reconnus, ils ont été largement étudiés pour leur implication dans l'assimilation de substrats hydrophobes en culture liquide, et plus spécifiquement les hydrocarbures tels que les *n*-alkanes (Beal et Betts, 2000; Hisatsuka *et al.*, 1971; Itoh et Suzuki, 1972;

Koch *et al.*, 1991; Noordman et Janssen, 2002). Les bactéries produisant des rhamnolipides sont ainsi en mesure de dégrader différents substrats hydrophobes car les surfactants « solubilisent » les hydrocarbures et les rendent plus faciles à récupérer et à assimiler (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Différents modes d'acquisition de substrats hydrophobes ont été soulignés au cours de plusieurs études de biodégradation (Bouchez-Naïtali et Vandecasteele, 2008; Bouchez Naïtali *et al.*, 1999)

D'un point de vue industriel, cette capacité des rhamnolipides à aider à la solubilisation de molécules hydrophobes est de plus en plus étudiée pour des enjeux de bioremédiation. En 1992, Zhang et Miller démontrent que la présence de rhamnolipides permet la dispersion d'octadécane et facilite leur biodégradation. Depuis, beaucoup de recherches portent sur la possibilité d'utiliser des cultures de micro-organismes producteurs de rhamnolipides pour la bioremédiation de substrats peu solubles (Arino et al., 1998; Chrzanowski et al., 2009; Kaczorek et al., 2008; Owsianiak et al., 2009a; Owsianiak et al., 2009b).

#### I.2.3. Facteurs affectant la production de rhamnolipides

Chaque micro-organisme est très sensible aux conditions de culture auxquelles il est soumis. En ce qui a trait aux biosurfactants, plusieurs facteurs ont été identifiés comme influençant grandement, de façon positive ou négative, les capacités de production des bactéries (Guerra-Santos et al., 1986; Nitschke et al., 2005; Rahman et al., 2002). Ainsi, les sources de carbone et d'azote représentent des facteurs clés. Mais le pH, la température, les sels minéraux, l'agitation, l'aération, etc. sont aussi des paramètres importants à définir pour chaque bactérie comme l'ont démontré les études récentes sur P. aeruginosa (Zhu et al., 2012).

#### I.2.3.1. La source de carbone

Il existe, en plus des sources inorganiques, trois grandes catégories de sources de carbone : les carbohydrates, les hydrocarbures, et les huiles végétales (Kim et al., 1997). Les sources de carbone solubles dans l'eau, comme le glycérol, le glucose, le mannitol et l'éthanol sont les plus fréquemment utilisées pour la production de rhamnolipides par *Pseudomonas* sp. (Aloush et al., 2006; Robert et al., 1989). Cependant, les résultats obtenus pour *P. aeruginosa* sont généralement moins bons avec ce type de substrat qu'avec des huiles végétales (Costa et al., 2009; Nitschke et al., 2005; Sim et al., 1997; Zhu et al., 2012). Des études réalisées sur *Burkholderia glumae* et *B. thailandensis* ont également démontré que l'huile de canola représentait une source bien plus rentable pour les bactéries que le glycérol, en termes

de production de rhamnolipides (Costa et al., 2011; Dubeau et al., 2009). Cependant, il est plus facile de purifier les rhamnolipides à partir de culture sur des milieux contenant du glycérol car les huiles végétales produisent des acides gras durant la culture qui interfèrent avec les procédés d'extraction (Parra et al., 1990).

#### I.2.3.2. La source d'azote

De nombreuses études ont démontré que, chez *P. aeruginosa*, une meilleure production de rhamnolipides était obtenue en utilisant du nitrate (NO<sub>3</sub>) comme source d'azote, plutôt que de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Manresa *et al.*, 1991; Venkata Ramana et Karanth, 1989). En revanche, des recherches récentes sur *B. glumae* ont quant à elles démontré que de meilleurs rendements de production étaient obtenus avec de l'urée plutôt qu'avec du nitrate ou de l'ammonium (Costa *et al.*, 2009).

Le suivi de plusieurs cinétiques révèlent que les biosurfactants sont produits dès que les conditions en azote deviennent limitantes (Guerra-Santos et al., 1984; Manresa et al., 1991; Robert et al., 1989; Venkata Ramana et Karanth, 1989). En réalité, l'ammonium, la glutamine, l'asparagine et l'arginine inhibe la production de rhamnolipides tandis que le nitrate, le glutamate et l'aspartate la stimule (Köhler et al., 2000; Mulligan et Gibbs, 1989; Venkata Ramana et Karanth, 1989). Bien que la raison exacte d'une telle préférence reste encore inconnue, Déziel et al. (2003) ont souligné la sous-expression des gènes de production des rhamnolipides (*rhlA* et *rhlB*, *cf.* section I.3.3.1) en présence de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, et l'effet inverse en présence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

# I.3. LES ORGANISMES PRODUCTEURS ET BIOSYNTHÈSE DES RHAMNOLIPIDES

Comme évoqué au début de la section 0, les rhamnolipides ont été identifiés pour la première fois chez *P. aeruginosa*, un pathogène opportuniste qui sera plus amplement présenté à la section suivante. À ce jour, cette bactérie est largement reconnue et étudiée pour la production de rhamnolipides. Pourtant, plusieurs autres espèces seraient également capables de sécréter ces tensioactifs, dont d'autres pseudomonades comme, entre autres, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, etc. (Abouseoud *et al.*, 2008; Martinez-Toledo *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Tuleva *et al.*, 2002; Vasileva-Tonkova *et al.*, 2006). En 2005, Gunther *et al.* démontrent que *P. chlororaphis*, qui est une bactérie non-pathogène, produit également des rhamnolipides. Cette découverte est très intéressante

d'un point de vue industriel et commercial car *P. aeruginosa* étant un pathogène opportuniste, la cultiver à grande échelle représente un sujet très controversé, ce qui n'est pas le cas pour *P. chlororaphis*.

Plusieurs espèces de la classe des β-protéobactéries se sont révélées être d'intéressantes productrices de rhamnolipides. Elles appartiennent toutes au genre *Burkholderia* qui sera détaillé dans la section I.3.2. Il s'agit de *B. glumae, B. pseudomallei, B plantarii* et *B. thailandensis* (Andrä *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2011; Dubeau *et al.*, 2009; Häussler *et al.*, 1998; Pajarron *et al.*, 1993).

Il est à noter que de toutes les souches identifiées comme étant productrices de rhamnolipides, certaines sont moins pathogènes que d'autres, voire non-virulentes comme c'est le cas pour *P. chlororaphis* mais également pour *B. thailandensis* qui est au centre des études menées dans ce document. Cela constitue un avenir très prometteur pour le marché des biosurfactants.

#### I.3.1. Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa est une γ-protéobactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Pseudomonadaceae (Van Delden et Iglewski, 1998; Winslow et al., 1920). Ubiquitaire dans l'environnement (eau, sol, plantes), ce bacille n'en est pas moins un pathogène opportuniste important, infectant plus généralement les personnes immunodéprimées (plaies de grands brûlés, patients subissant un traitement de chimiothérapie, etc.) et les individus atteints de fibrose kystique. Cette bactérie est également une cause importante d'infections nosocomiales (Doggett et al., 1964; Floret et al., 2009; Kominos et al., 1972; Van Delden et Iglewski, 1998). D'ailleurs, cette bactérie a été découverte en 1882 à partir de plaies infectées de soldats dont les bandages affichaient une couleur bleue et verte (Gessard, 1884). Cette coloration caractéristique de P. aeruginosa est due à la production de pigments par la bactérie (pyocyanine et pyoverdine) qui font partie de la large gamme de facteurs de virulence dont elle dispose (élastases, exotoxines, phospholipases, protéases, cyanure d'hydrogène, rhamnolipides, etc.) (Van Delden et Iglewski, 1998). Possédant également une grande capacité d'adaptation à son environnement, elle apparaît de plus en plus résistante aux traitements antibiotiques habituellement délivrés. Depuis plusieurs années maintenant, de nombreuses souches multirésistantes et particulièrement virulentes ont même été recensées (Aloush et al., 2006; Archibald et al., 1997).

Les études sur *P. aeruginosa* et sa pathogénicité sont de plus en plus nombreuses, particulièrement depuis le séquençage complet de son génome (Stover *et al.*, 2000). La compréhension de son métabolisme et de ses différents modes de régulation, notamment autour du *quorum sensing* (*cf.* 

section I.4), est désormais une des pistes principales pour contrer la recrudescence de sa virulence et aider au développement de thérapies antipathogènes.

Bien qu'elle ne soit pas la bactérie en cause dans les études présentées dans ce mémoire, *P. aeruginosa* demeure une référence quant à l'étude des rhamnolipides qu'elle produit, notamment pour avoir permis la compréhension des étapes biosynthèse de ces biosurfactants (détaillée en section I.3.3).

#### I.3.2. Le genre Burkholderia

La première bactérie appartenant au genre, qui sera plus tard nommé en son honneur, a été isolée par le pathologiste botanique américain Walter H. Burkholder en 1949 à partir de plants atteints de la « sour skin », soit la maladie de la pourriture d'oignons (Burkholder, 1948, 1950). Cette espèce bactérienne fut originalement appelée *Pseudomonas cepacia*. En effet, les différents tests d'identification de la bactérie révélaient une similitude avec les espèces du genre *Pseudomonas*. La nomenclature de cette bactérie a perduré pendant plusieurs décennies, jusqu'à ce que des analyses d'homologies de l'ARNr 16S de quelques autres espèces, dont *Pseudomonas pseudomallei* et *Pseudomonas mallei*, aboutissent à la création du nouveau genre bactérien *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Dès lors, plusieurs espèces de *Pseudomonas* qui avaient été isolées de patients humains, mais qui étaient également capables d'infecter les plantes, ont changé de nomenclature. Ainsi, le genre *Burkholderia* rassemble aujourd'hui plus de 70 espèces différentes, notamment la plupart des pseudomonades qui appartenaient au groupe d'homologie II, et incluant certains pathogènes humains importants (Euzéby, s. d.; Lipuma, 2007; Stoyanova *et al.*, 2007). Le génome de ce genre étant très dynamique, de nouvelles espèces sont régulièrement découvertes (Lu *et al.*, 2012; Sheu *et al.*, 2012).

Tout comme le genre *Pseudomonas*, le genre *Burkholderia* rassemble des bactéries ubiquitaires (eau, sols, plantes, insectes, hôpitaux, etc.). Cependant, ce genre appartient à la classe des β-protéobactéries. Malgré leur phylogénie rapprochée (*cf.* Figure 6), les bactéries du genre *Burkholderia* ont des profils très variés. Sont recensés aussi bien des phytopathogènes comme *B. glumae* (ravageur du riz au Japon) et *B. plantarii*, que des pathogènes opportunistes tels que *B. cenocepacia* et *B. multivorans* (infection des personnes atteintes de la granulomatose septique chronique ou de la fibrose kystique) ou encore des souches vivant en symbiose avec des champignons (*B. fungorum*) ou des insectes (Ballard *et al.*, 1970; George *et al.*, 2009; Stoyanova *et al.*, 2007; Vial *et al.*, 2011).

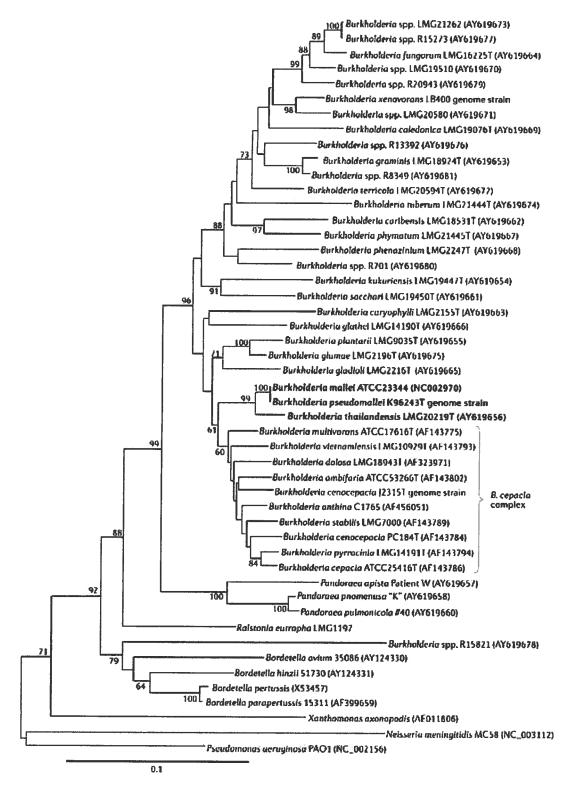


Figure 6 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences recA de certaines espèces du genre Burkholderia et des genres reliés. Tiré de Payne et al. (2005).

Tableau 4 : Espèces de Burkholderia communément associées aux infections humaines. FK = Fibrose kystique. Tableau adapté de Lipuma (2007).

Espèces	Habitat	Référence
« <i>B. cepacia</i> complex » ou	Всс	
B. cepacia	Homme (FK et non-FK), sols, rhizosphères, eau, plantes	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997)
B. multivorans	Homme (FK et non-FK), sols, rhizosphères, eau, matériel végétal, contaminants industriels	(Vandamme et al., 1997)
B. cenocepacia	Homme (FK et non-FK), animaux, sols, rhizosphères, eau, plantes, contaminants industriels	(Vandamme et al., 2003)
B. stabilis	Homme (FK et non-FK), rhizosphères, matériel hospitalier	(Coenye et al., 2001)
B. vietnamiensis	Homme (FK et non-FK), sols, rhizosphères, matériel végétal, animaux	(Coenye et al., 2001)
B. dolosa	Homme (FK), matériel végétal, rhizosphères	(Vermis et al., 2004)
B. ambifaria	Homme (FK), sols, rhizosphères	(Coenye et al., 2001)
B. anthina	Homme (FK), animaux, sols, rhizosphères, eau de rivière	(Vandamme et al., 2002)
B. pyrrocinia	Homme (FK et non-FK), sols, rhizosphères, eau	(Vandamme et al., 2002)
B. ubonensis	Homme (non-FK), sols	(Vanlaere et al., 2009)
B. latens	Homme (FK)	(Vanlaere et al., 2008)
B. diffusa	Homme (FK et non-FK), sols, équipement hospitalier	(Vanlaere et al., 2008)
B. arboris	Homme (FK et non-FK), sols, rhizosphères, eau, contaminants industriels	(Vanlaere et al., 2008)
B. seminalis	Homme (FK et non-FK), matériel végétal, rhizosphères	(Vanlaere et al., 2008)
B. metallica	Homme (FK)	(Vanlaere et al., 2008)
B. contaminans	Homme (FK et non-FK), sols, animaux, équipement hospitalier	(Vanlaere et al., 2009)
B. lata	Homme (FK et non-FK), sols, matériel végétal, eau	(Vanlaere et al., 2009)
. mallei	Animaux (morve chez le cheval, la mule et l'âne), Homme (occasionnellement)	(Yabuuchi <i>et al.,</i> 1992)
. pseudomallei	Homme (mélioïdose), animaux, eau, sols, rhizosphères	(Yabuuchi <i>et al.</i> , 1992)

Grâce à des études taxonomiques approfondies de *B. cepacia*, des espèces très similaires, appelées génomovars, ont été regroupées au sein du « *Burkholderia cepacia* complex », ou Bcc. À ce jour, au moins 17 espèces y sont recensées et présentées dans le Tableau 4 (Coenye et Vandamme, 2003; Lipuma, 2007; Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 1997; Vanlaere *et al.*, 2008). Elles sont reconnues pour leur versatilité et leur capacité à causer des infections chroniques du tractus respiratoire chez des patients immunodéprimés (Vandamme *et al.*, 2003). Certains patients atteints de fibrose kystique peuvent même contracter le "syndrome *cepacia*" qui se caractérise par une pneumonie nécrosante et une septicémie aboutissant à une rapide détérioration de l'état clinique (Mahenthiralingam *et al.*, 2005). Cependant, dans un environnement naturel et notamment chez les plantes, plusieurs espèces de Bcc ont la particularité de pouvoir se révéler soit pathogènes, soit au

contraire symbiotiques et protectrices en éliminant certains agents toxiques tels que les composés aromatiques chlorés (Eberl, 2006; Venturi *et al.*, 2004). Elles pourraient donc être utilisées comme agent de biocontrôle dans les processus de biorestauration et comme stimulant pour la croissance des plantes (Chiarini *et al.*, 2006; Lipuma, 2005). Mais c'est sans compter sur leur pathogénicité qui les rend, *a priori*, impropres à de telles applications (Vial *et al.*, 2011).

# I.3.2.1. Burkholderia pseudomallei

Le genre Burkholderia comporte aussi de redoutables pathogènes, tel que B. pseudomallei, un pathogène important, aussi bien pour l'humain que pour certains animaux. Cette bactérie est en effet l'agent causatif de la mélioïdose qui est une maladie de l'humain se manifestant soit sous forme d'infection pulmonaire bénigne, soit par une pneumonie chronique, ou encore par une septicémie envahissante (Cheng et Currie, 2005). Le premier cas de mélioïdose a été rapporté par un médecin de l'armée en Birmanie en 1912 (Aung et Mar, 2008). La bactérie responsable a été isolée par Whitmore à partir d'un abcès chez un malade décédé et décrite pour la première fois en 1913 (Whitmore, 1913). Elle est alors appelée Bacillus pseudomallei. En 1957, Haynes transfère cette bactérie dans le genre Pseudomonas car son identification, basée sur un profil analytique API, était très similaire à Pseudomonas aeruginosa (Ashdown, 1979; Haynes et Burkholder, 1957). Comme déjà mentionné dans la section précédente, les avancées techniques et la comparaison de séquences d'ARNr 16S ont conduit, quelques années plus tard, à la création d'un nouveau genre bactérien et P. pseudomallei est alors devenue B. pseudomallei (Yabuuchi et al., 1992).

Bien que cette bactérie soit classée parmi les pathogènes nécessitant une manipulation dans un laboratoire de confinement de type 3 et considérée par le HSS (« U.S. Department of Health and Human Services ») comme agent potentiel de bioterrorisme, sa présence dans l'environnement est ubiquitaire (Brett et al., 1997; Rotz et al., 2002). Elle est le plus souvent retrouvée dans les sols humides et les eaux stagnantes des régions endémiques telles que l'Asie du sud-est (notamment la Thaïlande) et au nord de l'Australie (Brett et al., 1997; Dance, 2000; Leelarasamee et Bovornkitti, 1989; Woods, 2002). Mais elle est également présente en Afrique, en Asie du sud, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud.

Les principales études chez *B. pseudomallei* portent sur sa virulence et sur le système de sécrétion de type III (Haraga *et al.*, 2008). Lors d'une étude reposant sur l'infection du hamster Syrien doré par la bactérie isolée du sol, plusieurs souches différentes sont sélectionnées car elles présentent quelques caractères phénotypiques particuliers et, surtout, elles sont beaucoup moins virulentes que les

souches de *B. pseudomallei* (Brett *et al.*, 1997). Elles sont alors identifiées comme étant « *pseudomallei*-like ». Il s'agit en fait de souches de *Burkholderia thailandensis*.

#### I.3.2.2. Burkholderia thailandensis

B. thailandensis ressemble beaucoup à B. pseudomallei. En effet, les premiers tests d'homologie d'ARNr 16s effectués par l'équipe de Brett (1998) sur 1488 pb ont montré que les deux souches ne différaient que par 15 nucléotides (98,99% de similarité). Les chercheurs affirment cependant qu'il est possible de caractériser cette nouvelle espèce par des spécificités phénotypiques, et ils proposent la nomenclature de Burkholderia thailandensis. Ce n'est qu'en 2000 que l'équipe de Yabuuchi effectue les études d'homologie ADN-ADN entre plusieurs espèces de Burkholderia. Les résultats obtenus permettent de confirmer la validité de l'espèce B. thailandensis (Yabuuchi et al., 2000).

La similarité entre les génomes de *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* a été évaluée en 2000 par hybridation ADN-ADN et a atteint jusqu'à 66,8% ce qui représente une haute concordance (Yabuuchi *et al.*, 2000). Pourtant, la principale caractéristique de *B. thailandensis* est qu'il est quasiment avirulent chez les mammifères, tel que confirmé par les études de l'équipe de Haraga (Brett *et al.*, 1998; Haraga *et al.*, 2008). Cette particularité d'extrême ressemblance génétique entre un important pathogène et son jumeau avirulent fait de *B. thailandensis* un sujet d'étude idéal. En effet, cette bactérie peut servir de modèle alternatif pour l'étude de *B. pseudomallei*, et même pour *B. mallei* qui, étant classées parmi les pathogènes de type 3, requièrent des installations de laboratoire très spécialisées et réglementées (Haraga *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont ainsi été menées chez *B. thailandensis* dans le but de mettre en évidence ou de comprendre différents phénomènes chez *B. pseudomallei*, en particulier pour des systèmes en lien avec la virulence (Harley *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). En effet, malgré son profil inoffensif, *B. thailandensis* conserve paradoxalement bon nombre de gènes et systèmes actifs liés à la virulence. Bien que les deux souches vivent dans les mêmes environnements (*B. thailandensis* a été retrouvée dans les rizières du Centre et du Nord-Est de la Thaïlande), il a été récemment proposé que les différences dans la virulence de ces deux souches pourraient simplement être attribuées à une adaptation de leur génome pour développer des stratégies divergentes quant à leur niche écologique respective (Kim *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2008).

Évidemment, *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* diffèrent sous certains aspects. Par exemple, la première est capable d'assimiler l'arabinose, le 5-céto-gluconate et l'adonitol, tandis que la deuxième peut utiliser l'erytritol et le dulcitol (Brett *et al.*, 1998). D'autres études portant sur les différences entre les deux espèces ont permis d'avancer dans les connaissances sur le fonctionnement de chacune des deux bactéries, et aussi d'identifier un polysaccharide capsulaire potentiellement relié à la virulence de *B. pseudomallei* (Kespichayawattana *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Reckseidler *et al.*, 2001).

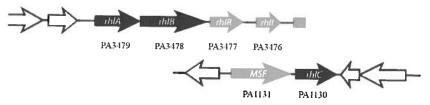
## I.3.3. Biosynthèse des rhamnolipides

#### I.3.3.1. Gènes responsables de la biosynthèse

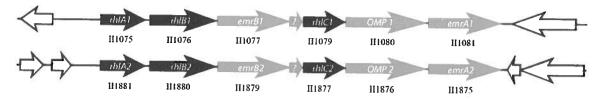
Les gènes responsables de la biosynthèse des rhamnolipides ont été identifiés chez le premier organisme producteur découvert : *P. aeruginosa*. Il s'agit des gènes *rhlA, rhlB* et *rhlC* illustrés à la Figure 7 (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001). La fonction des protéines codées sera détaillée à la section suivante. En 2005, le génome complet d'une souche de *B. thailandensis* est séquencé (Kim *et al.*, 2005). Il comprend, comme pour *B. pseudomallei*, deux chromosomes (chrl : 3 809 kpb ; chrll : 2 914 kpb). Il a alors été possible d'identifier de proches orthologues des gènes codant pour RhlA, RhlB et RhlC (Dubeau *et al.*, 2009). Contrairement à *P. aeruginosa*, les trois gènes sont inclus au sein d'un même opéron. Les autres gènes compris dans cet opéron codent pour des protéines encore mal définies mais qui présentent des homologies avec des protéines d'*Escherichia coli* impliquées dans le complexe EmrAB-TolC pour l'efflux de composés liés à la résistance (Dubeau *et al.*, 2009; Nichayapun, 2005). Ces autres gènes pourraient donc éventuellement intervenir dans l'efflux des rhamnolipides mais aucune étude n'a encore été menée en ce sens (Dubeau *et al.*, 2009).

Une des grandes particularités du génome de *B. thailandensis*, comme pour *B. pseudomallei*, est de posséder, par des phénomènes de duplication, plusieurs segments de son patrimoine génétique en multiple copies. C'est le cas pour l'opéron *rhl*: deux copies complètes et 100% identiques de l'opéron sont retrouvées sur le chromosome II à plus de 1 000 kpb l'une de l'autre (*cf.* Figure 7) (Dubeau *et al.*, 2009).

#### Pseudomonas aeruginosa PAO1:



#### Burkholderia thailandensis E264:



#### Burkholderia pseudomallei 1710b:

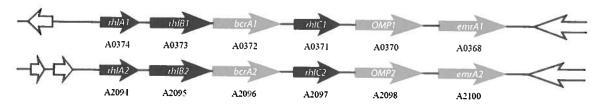


Figure 7: Schéma de l'agencement génétique des opérons rhl de B. thailandensis, B. pseudomallei et P. aeruginosa (Dubeau et al., 2009; Winsor et al., 2008; Winsor et al., 2011). En noir : les gènes rhl; En gris : les gènes du même opéron dont certains ne sont qu'hypthétiques. OMP: Outer Membrane Protein. MSF: Major Facilitator Superfamily transporter. ?: Gène codant pour une protéine hypothétique.

Des études menées par Dubeau *et al.* (2009) démontrent que les deux opérons sont fonctionnels mais contribuent à la production de rhamnolipides dans des proportions différentes. En effet, les tests effectués sur des mutants polaires Δ*rhlA1* et Δ*rhlA2* ont révélés que, sous certaines conditions, l'opéron II seul (le plus en aval sur le chromosome II) conduit à la production de jusqu'à trois fois plus de rhamnolipides que l'opéron I seul (*cf.* Figure 8). Par ailleurs, en sommant la production de chacun des mutants simples, le niveau de production de la souche sauvage n'est pas égalé. Cela suggère qu'une régulation croisée existerait entre les deux opérons afin de stimuler la production totale de rhamnolipides dans la souche sauvage.

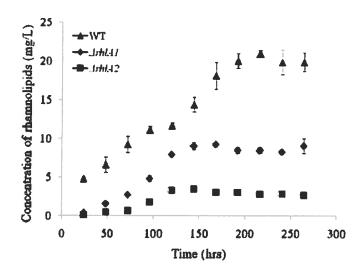


Figure 8: Production totale de rhamnolipides par la souche sauvage B. thailandensis E264 ainsi que chacun des mutants simples ΔrhlA lors d'une culture en milieu NB supplémenté de glycérol (2%) (Dubeau et al., 2009).

B. thailandensis n'est pas la seule souche du genre Burkholderia à disposer des gènes nécessaires à la production de rhamnolipides. D'ailleurs, comme déjà mentionné à la section I.3, B. pseudomallei, B. glumae, ou encore B. plantarii en produisent. D'autres bactéries comme B. ambifaria, B. cenocepacia, et B. mallei semblent posséder le patrimoine génétique nécessaire mais il n'a jamais été démontré qu'elles produisent des rhamnolipides en laboratoire (Dubeau, 2009).

# I.3.3.2. Voie de biosynthèse

## 1.3.3.2.1. Découverte chez P. aeruginosa

Comme déjà mentionné à la section 0, les rhamnolipides ont été initialement découverts chez *P. aeruginosa*. Leur voie de biosynthèse a d'abord été étudiée *in vivo* à l'aide de précurseurs radioactifs (acétate et glycérol C<sub>14</sub>) puis grâce à des essais enzymatiques (Burger *et al.*, 1963; Hauser et Karnovsky, 1957, 1958). La proposition de biosynthèse qui a découlé de ces expériences s'appuyait sur deux réactions successives de transfert de groupes glycosylés impliquant deux rhamnosyltransférases disctinctes (*cf.* Figure 9) (Burger *et al.*, 1963).

Figure 9: Modèle initial de biosynthèse des rhamnolipides chez P. aeruginosa (Burger et al., 1963; Ochsner et al., 1994a).

En 1994, soit plus de 30 ans plus tard, la première rhamnosyltransférase est identifiée avec la découverte des gènes *rhlA* (32.5 kDa) et *rhlB* (47 kDa) et la mise en évidence de l'activité catalytique de RhlB pour former un monorhamnolipide (Ochsner *et al.*, 1994a) à partir de précurseurs que sont les HAA, eux-mêmes identifiés seulement en 2002 (Lépine *et al.*, 2002).

Ochsner et al. (1994b) révèlent également le rôle de *rhlR*, codant pour le régulateur transcriptionnel du système de QS *rhlRl*, en démontrant qu'il assure la régulation de la production des rhamnolipides. Ce n'est qu'en 2001 que la deuxième rhamnosyltransférase est identifiée : il s'agit de RhlC qui assure le couplage d'une deuxième molécule de rhamnose aux monorhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001). Tous les gènes impliqués se retrouvent très proches dans le génome,

exception faite de *rhlC* qui se situe au sein d'un opéron bicistronique dont le second gène code pour une protéine à la fonction encore inconnue à ce jour (*cf.* Figure 10). Cependant, il semblerait que *rhlC* soit régulé à un même niveau transcriptionnel que l'opéron *rhlAB* (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001), et ce *via* le système *rhlRI*.

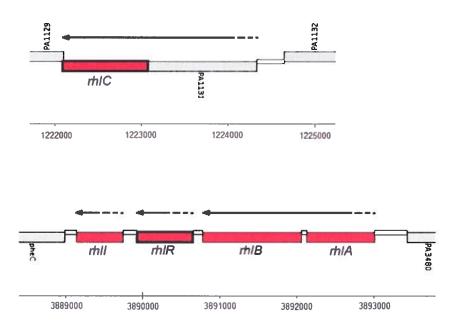


Figure 10: Schématisation de l'agencement des gènes responsables de la production de rhamnolipides et de leur régulation chez P. aeruginosa (Winsor et al., 2011).

Finalement, après quelques hypothèses variées, le rôle de RhlA est élucidé en 2008 : cette enzyme sert à la dimérisation de β-hydroxyacyl-ACP (HA-ACP) pour donner du β-hydroxydécanoyl-β-hydroxydécanoate, le HAA majoritaire retrouvé chez *P. aeruginosa* (cf. Figure 11) (Déziel et al., 2003; Zhu et Rock, 2008). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle *P. aeruginosa* produit en grande majorité des dirhamnolipides de type C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>. Jusqu'à très récemment, la voie de biosynthèse des HA-ACP, et donc des rhamnolipides, avait été décrite comme provenant du cycle des acides gras (Zhu et Rock, 2008). Cependant, de récentes recherches prouvent que leur origine découlerait majoritairement du cycle d'oxydation β dont les HA-ACP seraient en fait issus (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2013).

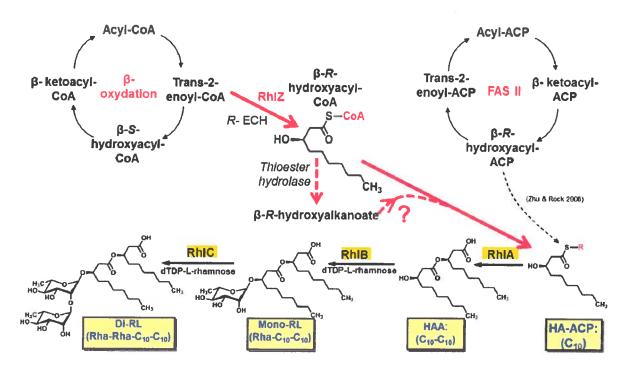


Figure 11: Voie de biosynthèse des rhamnolipides chez P. aeruginosa. Tiré de Abdel-Mawgoud et al. (2013)

Il est important de noter que la voie de biosynthèse des rhamnolipides a été uniquement élucidée chez *P. aeruginosa*.

### I.3.3.2.2. Chez B. thailandensis

Étant donné les homologies de séquences pour RhIA, RhIB et RhIC, il a été conclu que la voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *B. thailandensis* est la même que chez *P. aeruginosa* (cf. Figure 11). En revanche, *B. thailandensis* produit majoritairement des dirhamnolipides C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> car le précurseur majoritaire chez cette bactérie est le HAA de type C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>. Il a malgré tout été démontré que *B. thailandensis* est capable de produire différents congénères dans les proportions présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5: Les proportions relatives des différents rhamnolipides produits par B. thailandensis et P. aeruginosa (Deziel et al., 1999; Deziel et al., 2000; Dubeau et al., 2009).

Rhamnolipides	B. thailandensis	P. aeruginosa		
Congénères mono-rhamno-mono-lipidiques				
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	-	0,83		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	-	0,42		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	-	13,29		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	-	1,28		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	-	1,86		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	-	0,51		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	0,14	•		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	0,45	-		
Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	5,84	-		
Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	0,28	•		
Congénères di-rhamno-di-lipidiques				
Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	**	9,10		
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	-	4,45		
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	•	54,55		
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	0,18	6,15		
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	-	5,54		
Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	•	2,02		
Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	1,77	•		
Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	6,82	-		
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	76,99	-		
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	7,48	-		
Rha-Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	0,05	-		

Par homologie avec *P. aeruginosa*, il est probable que la transcription des gènes de biosynthèse des rhamnolipides chez *B. thailandensis* soit sous le contrôle du QS (Ulrich *et al.*, 2004c).

# 1.4. LE QUORUM SENSING (QS) ET LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES

# I.4.1. Principe du QS

Comme de nombreuses bactéries, *P. aeruginosa* possède plusieurs systèmes de régulation basés sur la densité de cellules dans le milieu (Pearson *et al.*, 1995). Le principe du *quorum sensing* (QS), aussi appelé communication cellulaire, repose en effet sur l'activation ou la répression coordonnée de gènes, dépendamment de la concentration de bactéries présentes dans un environnement et de la concentration de molécules de signalisation qu'elles diffusent (Miller et Bassler, 2001; Raina *et al.*, 2009).

D'abord découvert chez des bactéries à Gram négatif, le QS a également été étudié chez des bactéries à Gram positif (Miller et Bassler, 2001) et chez certains mycètes. Ne traitant dans ce mémoire que de bactéries à Gram négatif, seul le QS général de ce type de bactéries va être présenté.

Le QS a été initialement caractérisé chez l'espèce Vibrio fischeri (Photobacterium fischeri) chez qui le système luxRI contrôle la bioluminescence (Dunlap, 1999; Nealson, 1977). Chez les bactéries à Gram négatif, tous les systèmes de QS identifiés à ce jour fonctionnent globalement selon le même schéma et annotés de la même façon que pour le système luxRI (cf. Figure 12) : une ou plusieurs molécules de signalisation spécifiques (ou auto-inducteurs = AI) sont produites par une synthase (I), et sont reconnues par un ou plusieurs récepteurs précis (R). De manière générale, les bactéries à Gram négatif utilisent des acyl homosérines lactone (AHL) comme AI diffusible. Chaque bactérie sécrète ses molécules de signalisation à un niveau de base. Mais lorsque la densité cellulaire, et par conséquent la concentration en molécules de signalisation, dépasse un certain seuil, les récepteurs spécifiques sont activés (régulateurs transcriptionnels de type LuxR) et contrôlent alors l'activation ou la répression de nombreux gènes, notamment ceux liés à la virulence bactérienne (Miller et Bassler, 2001; Nadal Jimenez et al., 2012). Ils régulent également la transcription de leurs propres gènes créant ainsi une boucle d'auto-régulation.

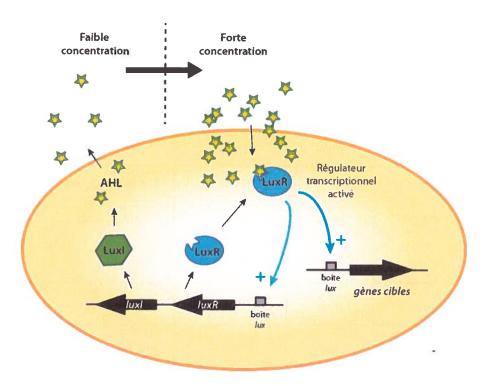


Figure 12: Représentation schématique du système de régulation densité-dépendante typique, le système de QS luxRI chez V. fischeri. AHL: molécule de signalisation de type acyl homosérine lactone, LuxI: synthase, LuxR: régulateur transcritpionnel. Adapté de Dubeau (2009)

Le Tableau 6 résume les homologues de type LuxI et LuxR ainsi que les AI correspondant connus chez diverses bactéries. Pour *B. thailandensis*, les systèmes de QS seront expliqués plus en détail à la section I.4.2.3. Un des trois systèmes de QS chez *P. aeruginosa* est légèrement différent des deux autres puisqu'il ne produit pas de AHL comme molécules de signalisation mais des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) intracellulaires, les plus connus étant le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et le *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) (Déziel *et al.*, 2004; Heeb *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2006). Par ailleurs, ce système nécessite l'action combinée de plusieurs gènes (*pqsA-D, pqsH*) pour produire ces molécules de signalisation de type HAQ.

Tableau 6 : Résumé des composantes de quelques systèmes de QS chez différentes bactéries. Adapté de Fuqua et al. (1996)

Organisme	Système	Synthase	Molécules de signalisation (AI)	Régulateur
Vibrio fischeri	luxRI	Luxi	AHL (3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL)	LuxR
Vibrio Jischen	ainRS	AinS	AHL (C <sub>8</sub> -HSL)	AinR
	lasRI	Lasi	AHL (3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL)	LasR
Pseudomonas aeruginosa	rhlRl	Rhli	AHL (C <sub>4</sub> -HSL)	RhIR
	MvfR/HAQ	Action combinée des gènes pqsA-D, pqsH	HAQ (HHQ, PQS)	MvfR
Agrobacterium tumefaciens	traRi	Tral	AHL (3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL)	TraR-TraM
Erwinia carotovora subsp. carotovora SCRI193	expRl	Expl	AHL (3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL)	ExpR
Erwinia carotovora subsp. carotovora SCC3193	carRI	Carl	AHL (3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL)	CarR
Erwinia stewartii	esaRI	Esal	AHL (3-oxo-C <sub>6</sub> -HSL)	EsaR

Au sein d'une bactérie, il existe souvent plus d'un système de QS et il a été démontré, notamment chez *P. aeruginosa*, qu'ils peuvent interagir entre eux, formant ainsi un réseau très complexe de régulation (Dekimpe et Deziel, 2009; Gilbert *et al.*, 2009; Latifi *et al.*, 1996; Schuster et Peter Greenberg, 2006; Xiao *et al.*, 2006). Les hiérarchies établies entre différents systèmes assurent ainsi à la bactérie une coordination parfaite de l'expression de ses gènes dépendamment des conditions environnementales.

#### I.4.1.1. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR

Les régulateurs transcriptionnels appartenant à la famille de protéines LuxR possèdent une structure caractéristique qui comprend deux domaines fonctionnels. Le premier, en région N-terminale, permet la fixation d'une molécule de signalisation qui lui est spécifique (ou auto-inducteur, AI), tandis que le deuxième domaine contient un motif de type hélice-tour-hélice en région C-terminale afin de se fixer à l'ADN à proximité d'un promoteur cible (De Bruijn et Raaijmakers, 2009; Fuqua et al., 1996; Patankar et González, 2009; Yang et al., 2009).

D'un point de vue biochimique, les régulateurs peuvent être classés en trois sous-groupes (Yang et al., 2009) : [1] les protéines nécessitant un AI pour se replier correctement et pour ensuite s'y lier très fortement (telles TraR et LasR de *P. aeruginosa*, et CepR de *Burkholderia cenocepacia*), [2] les protéines nécessitant un AI pour se replier correctement mais qui ensuite, se lient aux AI de façon réversible (telles QscR de *P. aeruginosa* et LuxR de *V. fischeri*), et enfin [3] les protéines pouvant se lier aux AI de façon réversible mais pour qui ces derniers ne sont pas indispensables à leur bon repliement (telles RhIR de *P. aeruginosa* et EsaR de *Pantoea stewartii*) (Schuster et Greenberg, 2008).

Comme mentionné dans la section précédente, les AI sont produits par des synthases homologues à LuxI, dont l'expression est régulée par les protéines de type LuxR au sein d'une boucle de rétroaction positive. Généralement, les gènes codant pour les protéines de type LuxI et LuxR se retrouvent très proches l'un de l'autre sur le chromosome et sont alors reconnus comme formant une « paire » de type *luxRI* (Patankar et González, 2009). Cependant, au fur et à mesure de l'étude des génomes bactériens, il a été révélé que certains gènes de type *luxR* ne sont pas associés à aucun homologue *luxI*. Appelés « régulateurs orphelins » (Fuqua, 2006), ces protéines ne peuvent pas réguler la synthèse de molécules de signalisation directement, mais peuvent interagir avec elles pour étendre le réseau des communications inter et intracellulaires (Chen et Xie, 2011; Patankar et González, 2009).

La plupart des régulateurs nécessitent des AI spécifiques et homologues pour leur fixation à l'ADN, et leur activité consiste alors en une activation ou une inhibition de la transcription du ou des gène(s) cible(s) (Chen et Xie, 2011). C'est le cas par exemple de LuxR, TraR, LasR, et QscR. Mais à l'inverse, certains homologues LuxR sont activateurs ou inhibiteurs de la transcription en absence de leur AI, et libèrent l'ADN après fixation de leur molécule de signalisation (par exemple EsaR de *Pantoea stewartii* ou CarR de *Erwinia carotovora*) (Chen et Xie, 2011; Patankar et González, 2009; Schuster et Greenberg, 2008). Enfin, quelques régulateurs peuvent se replier, se lier à l'ADN, et être ainsi actifs dans

la cellule sans l'aide de ces molécules. Il s'agit très souvent des protéines comprises dans le troisième sous-groupe décrit précédemment, dont la plupart agissent en tant qu'inhibiteurs (Chen et Xie, 2011).

Une propriété importante des protéines de type LuxR est leur multimérisation, tel qu'il a été démontré in vivo pour LuxR de V. fischieri et LasR de P. aeruginosa (Kiratisin et al., 2002; Schuster et Greenberg, 2008). En effet, certains régulateurs sont capables de former des homodimères, des hétérodimères ou des multimères, dépendamment du contexte cellulaire et de la présence de leur Al. Ainsi assemblés, les régulateurs peuvent se retrouver activateurs ou inhibiteurs de la transcription. Les régulateurs multimériques reconnaissent des séquences palindromiques caractéristiques en amont des gènes cibles, appelées « opérateurs lux » ou « boîtes lux » (Patankar et González, 2009; Schuster et Greenberg, 2008). Ces séquences sont d'ailleurs supposées être le site d'attachement du régulateur à l'ADN (Fuqua et al., 1996).

# 1.4.2. Le QS chez les bactéries du genre Burkholderia

### I.4.2.1. Généralités sur le QS des Bcc

Comme la vaste majorité des espèces bactériennes à Gram négatif, les bactéries du genre Burkholderia utilisent des systèmes de QS pour coordonner leurs activités bactériennes. La première découverte en lien avec le QS d'une espèce de Burkholderia a été rapportée chez une souche de Bcc (Mckenney et al., 1995). Ces études ont abouti à l'identification des premiers homologues de type luxRI chez une bactérie du genre Burkholderia, B. cenocepacia K56-2 (Lewenza et al., 1999). Ces gènes, alors appelés cepR et cepI, sont identiques à 36% et 38% aux gènes rhIR et rhII de P. aeruginosa, respectivement. La synthase CepI est responsable de la synthèse d'AHL de type C<sub>8</sub>-HSL ainsi qu'un peu de C<sub>6</sub>-HSL (Lewenza et al., 1999). Sur le modèle du système luxRI, le système cepRI fonctionne selon une boucle de rétroaction positive et CepR, associé aux AHL, reconnaît une boîte de type lux, aussi appelée « boîte cep » en amont des gènes qu'il régule (Lewenza et Sokol, 2001).

Après recherche d'homologie au sein des Bcc, il est très vite apparu que les gènes du QS y sont très bien conservés et toutes les souches étudiées ont révélé un système équivalent à *cepRI* (*cf.* Tableau 7) (Gotschlich *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2004; Lutter *et al.*, 2001). En plus de ce système et des C<sub>8</sub>- et C<sub>6</sub>- HSL produites, plusieurs souches de *B. vietnamiensis* sécrètent également du C<sub>10</sub>-HSL *via* un second système de QS appelé *bviRI* (Conway et Greenberg, 2002; Gotschlich *et al.*, 2001; Lutter *et al.*, 2001). Cependant, les interactions entre les deux systèmes de QS ne sont pas encore élucidées.

Tableau 7: Résumé des gènes du QS et des AHL produites chez différentes espèces de Bcc. Adapté de Venturi et al. (2004).

Espèce		avec les es (%)	Présence d'un	Types d'AHL	
	сері	cepR système bviRI		(en gras : majoritaire)	
B. cepacia	100	100	Non	<b>C</b> <sub>8</sub> -, C <sub>7</sub> -, C <sub>6</sub> -HSL	
B. multivorans	78	94	Non	C <sub>8</sub> -, C <sub>7</sub> -, C <sub>6</sub> -HSL	
В. сепосерасіа	98	97	Non	C <sub>8</sub> -, C <sub>7</sub> -, C <sub>6</sub> -HSL	
B. stabilis	97	95	Non	C <sub>8</sub> -, C <sub>6</sub> -HSL	
B. vietnamiensis	91-97	96-97	Oui	C <sub>10</sub> -, C <sub>8</sub> -, C <sub>6</sub> -, C <sub>12</sub> -HSL 3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL	
B. dolosa	92	93	Non	n.d.	
B. ambifaria	96	93	Non	C <sub>8</sub> -, C <sub>6</sub> -HSL	

n.d.: non déterminé

Des études portant sur le QS des Bcc ont démontré son implication dans le contrôle de la motilité de type « swarming », dans la maturation de biofilms, et dans la production de plusieurs facteurs de virulence (Huber et al., 2001; Kooi et al., 2006; Lewenza et al., 1999; Lewenza et Sokol, 2001; Sokol et al., 2003). Les rhamnolipides étant impliqués dans la motilité de type swarming (cf. section I.2.2.2), et sous le contrôle du QS chez P. aeruginosa (cf. section I.3.3.2.1), il est possible qu'ils soient aussi sous le contrôle du QS chez les souches du Bcc.

#### I.4.2.2. Le QS de B. pseudomallei et B. mallei

Le QS chez les espèces *B. pseudomallei* et *B. mallei* est plus complexe que chez les Bcc. Au total, cinq homologues LuxR et trois homologues LuxI ont été identifiés chez *B. pseudomallei* (Song *et al.*, 2005; Ulrich *et al.*, 2004a). Les systèmes, appelés alternativement *pml*, *bps* et *bpm*, sont à l'origine de la production de cinq AHL différents qui ont été retrouvé lors d'analyses du surnageant de culture : C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>8</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL, et 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL. Les trois gènes codant pour les synthases homologues à LuxI sont responsables de la production de ces AHL mais des mutations dans les gènes *bpml1* et *bpml3* ne réduit pas la synthèse de ces molécules, suggérant ainsi un rôle plus important de Bpml2 dans la production totale (Ulrich *et al.*, 2004a). Une des études basées sur les rôles et les interactions des systèmes de QS de *B. pseudomallei* a révélé que les régulateurs répondaient à plusieurs AHL différents et qu'ils pouvaient former des homodimères ou bien des hétérodimères, régulant alors de façon positive ou négative (selon l'association de régulateurs) différents gènes cibles (Kiratisin et Sanmee, 2008).

Le réseau de QS de *B. mallei* s'est révélé être très semblable à celui de *B. pseudomallei* à la différence près que le système de QS *bpmR12*, présent chez *B. pseudomallei* (qui présente d'ailleurs la

plus forte homologie avec le système *bviRI* de *B. vietnamiensis*), est absent chez *B. mallei* (Ulrich *et al.*, 2004b). La comparaison des deux génomes semble indiquer que la région codant pour le système *bpmRI2* a été supprimée durant l'évolution récente des espèces (Ong *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.3. Le QS de B. thailandensis

B. thailandensis comprend plusieurs systèmes complexes de QS très semblables à ceux de B. pseudomallei mais encore très peu étudiés à ce jour. Aussi, les gènes qu'ils régulent et les interactions croisées entre les systèmes sont encore très mal compris. La Figure 13 schématise sommairement les systèmes tels qu'ils sont connus aujourd'hui, incluant des données du laboratoire Déziel non-publiées. Ces différents éléments sont présentés à la prochaine section.

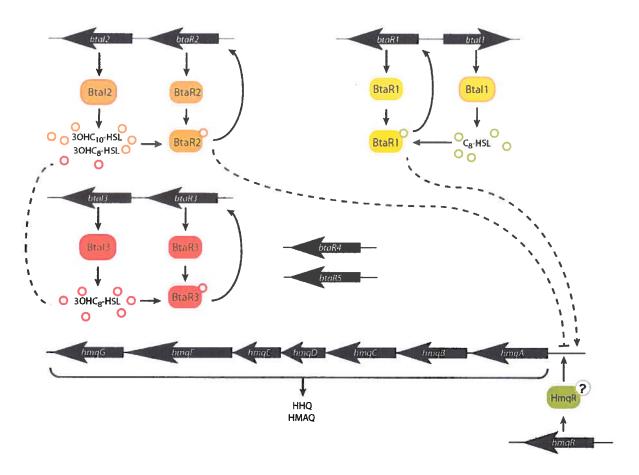


Figure 13: Le quorum sensing chez Burkholderia thailandensis.

#### I.4.2.3.1. Systèmes BtaRI

Chez B. thailandensis, trois systèmes complets de type luxRI ont été identifiés : btaRI1, btaRI2 et btaRI3. En plus de ces trois systèmes, B. thailandensis possède deux régulateurs de type LuxR orphelins que sont BtaR4 et BtaR5 (Ulrich et al., 2004c). Leur(s) molécule(s) de signalisation n'ont pas encore été identifiées. En revanche, les trois systèmes complets utilisent des AHL comme molécules de signalisation: la première synthase, Btal1, produit du C8-HSL, Btal2 produit surtout du 3-OH-C10-HSL mais aussi du 3-OH-C8-HSL dans des proportions bien moindre, et enfin Btal3 synthétise le 3-OH-C8-HSL (Chandler et al., 2009; Duerkop et al., 2008; Duerkop et al., 2007; Duerkop et al., 2009; Song et al., 2005). De par leur proximité génétique avec les trois gènes de synthases, les régulateurs BtaR1, BtaR2 et BtaR3 ont été tout naturellement associés respectivement à Btal1, Btal2 et Btal3. Pourtant, il semblerait que BtaR2 se lie aussi bien au 3-OH-C10-HSL que le 3-OH-C8-HSL, ce qui suggère qu'il soit aussi bien le régulateur associé à Btal2 qu'à Btal3. De la même manière, comme le 3-OH-C8-HSL est la molécule de signalisation associée à BtaR3, et qu'elle est produite aussi bien par Btal2 que Btal3, encore une fois, BtaR3 serait un régulateur associé aussi bien à Btal2 qu'à Btal3. De plus, étant donné la grande similarité entre B. pseudomallei et B. thailandensis, il est probable que les associations homo- ou hétérodimériques des régulateurs de type LuxR démontrées chez B. pseudomallei (cf. section 1.4.2.2) existent également chez B. thailandensis.

Assez peu d'études ont été menées sur les cibles de ces systèmes de QS. Cependant, leurs homologues ont été étudiés chez d'autres souches du genre *Burkholderia*. Il apparaitrait que, entre autres, le système *btaRl1* régule un phénomène d'agrégation des cellules, et que le système *btaRl2* régule la production d'un antibiotique contre les bactéries à Gram positif (Chandler *et al.*, 2009; Duerkop *et al.*, 2009). Bien sûr, le QS régule bien d'autres gènes mais il est si complexe chez *B. thailandensis* que les recherches ne permettent pas de définir clairement quelles cibles sont visées par chacun des systèmes de QS.

Il semble évident que tous ces systèmes de QS sont interconnectés et se régulent les uns les autres (cf. Figure 13). Cependant, aucune hiérarchie n'a pour l'instant été mise en évidence. Nous savons également qu'ils interagissent avec un autre système qui pour l'instant, bien qu'il présente des similitudes avec le système MvfR/HAQ de P. aeruginosa, n'a pas été officiellement reconnu comme étant un système de QS chez B. thailandensis (Diggle et al., 2006; Vial et al., 2008). Il s'agit du système des HMAQ.

#### I.4.2.3.2. Système des HMAQ

Tout comme l'opéron pqs chez P. aeruginosa qui est à l'origine de la production de HAQ (cf. section I.4), B. thailandensis possède un opéron dont les cinq premiers gènes sont des homologues de pqsABCDE: il s'agit de l'opéron hmq (Diggle et al., 2006; Vial et al., 2008). Pourtant, B. thailandensis ne produit pas exactement les mêmes HAQ que P. aeruginosa. En fait, elle produit des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), c'est-à-dire des HAQ avec un groupement méthyl en position 3 (Vial et al., 2008). En effet, l'opéron hmq comprend deux gènes supplémentaires: hmqF et hmqG. HmqF est responsable de la production d'acyl-S-ACP gras trans-β,γ-insaturé à partir de chaines moyennes d'acides gras pour la voie de biosynthèse de HMAQ insaturées (Agarwal et al., 2012). HmqG, quant à elle est l'enzyme responsable de l'ajout du groupement méthyl en position 3 des HMAQ (Vial et al., 2008). Il est important de noter que HmqE (tout comme PqsE de P. aeruginosa) possède une fonction encore inconnue à ce jour et il n'a pas été démontré qu'elle intervient dans la synthèse des HMAQ.

Aucun homologue de *mvfR*, le régulateur transcriptionnel du système MvfR/HAQ chez *P. aeruginosa*, n'a été retrouvé proche de l'opéron *hmq* chez *B. thailandensis* ou chez une autre espèce du genre *Burkholderia* (Vial *et al.*, 2008). Pourtant, les études de l'équipe du Professeur Déziel (Vial *et al.*, 2008, et résultats non publiés) ont clairement démontré l'impact de l'opéron *hmq* sur le QS de *B. ambifaria*. En effet, des mutations polaires des gènes *hmqA* ou *hmqG* conduisent à une augmentation de la production d'AHL et, par conséquent, à une accentuation des phénotypes sous le contrôle du QS (activité antifongique, production de sidérophores, activité protéolytique).

Parallèlement, des études menées par mutagénèse aléatoire par transposon Tn5, dans le but d'identifier un régulateur de l'opéron hmq chez B. thailandensis, ont révélé un régulateur transcriptionnel majeur. En effet, une mutation du gène BTH\_I1403, annoté comme un régulateur transcriptionnel de type LysR, a pour effet d'abolir la production des HMAQ (Dumais, 2010). Bien que ce gène soit situé sur le chromosome I, et non proche de l'opéron hmq (chromosome II), il semblerait qu'il soit étroitement lié au contrôle de ce dernier puisqu'il est indispensable à la production des HMAQ. Paradoxalement, des analyses in silico ont révélé qu'aucune boîte de fixation pour un régulateur transcriptionnel de type LysR ne semble présente au sein du promoteur de l'opéron hmqABCDEFG (Vial et al., 2008). Il est donc possible que le produit du gène BTH\_I1403, redéfini hmqR, ne soit pas un régulateur direct de l'opéron hmq. Il n'a pas été non plus démontré que HmqR fixe les HMAQ ou soit sensible à leur niveau de production, ni qu'HmqR régule sa propre transcription. Enfin, aucune molécule de signalisation n'a pour l'instant été associée à ce régulateur.

À ce jour, malgré son homologie avec l'opéron pqs, le système des HMAQ n'est donc pas complet et ne peut pas être clairement identifié comme un système de QS. Mais les études tendent à confirmer son implication dans la communication intercellulaire chez B. thailandensis.

# I.4.3. Lien entre QS et production de rhamnolipides chez *B. thailandensis* : résultats préliminaires

Jusqu'alors, il n'a jamais été démontré que la production de rhamnolipides soit sous le contrôle du QS chez *B. thailandensis* ou chez une autre souche du genre *Burkholderia*. Pourtant, chez *P. aeruginosa*, la production de ces biosurfactants est effectivement sous le contrôle du système *rhlRl*. Chez les espèces du genre *Burkholderia*, la motilité de type « swarming » et la formation de biofilm sont le contrôle du QS. Or les rhamnolipides étant indispensables à l'établissement de ces phénotypes, il est probable que leur synthèse soit également sous le contrôle du QS.

Quelques expériences préliminaires (non publiées) ont été réalisées au sein du laboratoire Déziel afin d'investiguer cette hypothèse. Elles ont révélé qu'un mutant polaire hmqR surproduisait grandement les rhamnolipides. Par ailleurs, trois doubles mutants hmqR-btal (btal1 à 3) ont été créés et la production de rhamnolipides a été suivie semi-quantitativement sur quelques jours grâce à des « drop collapsing tests ». Il s'est avéré que le mutant hmqR-btal3 semblait générer davantage de rhamnolipides que les mutants simples séparément (Audrée Lachance, 2010, résultats non publiés). En revanche, une autre expérience évaluant la production de ces biosurfactants par un mutant hmqA, après 48h de culture, ne semblait pas révéler de différence quant à la production totale par rapport à la souche sauvage (Dubeau, 2009). Le régulateur transcriptionnel HmqR interviendrait donc indépendamment de l'opéron des HMAQ sur la voie de biosynthèse des rhamnolipides. Ces résultats préliminaires suggèrent donc clairement un effet du QS sur la production de rhamnolipides chez B. thailandensis.

# 1.5. LA PROBLÉMATIQUE

Bien que la production de rhamnolipides et sa régulation aient été exhaustivement étudiées chez *P. aeruginosa*, très peu de recherches ont ciblé ce même objectif chez d'autres micro-organismes. *B. thailand*ensis est une des très rares bactéries non-pathogènes reconnue pour générer ces biosurfactants. Une meilleure compréhension de ses systèmes de production pourrait, à plus grande échelle, servir deux enjeux indépendants : comprendre et maîtriser les rhamnolipides comme facteurs de virulence chez *B. pseudomallei*, mais aussi stimuler la production à son maximum chez *B. thailandensis* pour une éventuelle application industrielle. Ainsi, les travaux présentés dans ce mémoire visent une meilleure compréhension de la régulation de la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*.

# 1.5.1. Les hypothèses du projet

Au vu des résultats préliminaires présentés dans les sections I.3.3 et I.4.3, et par homologie avec les systèmes de régulation de *P. aeruginosa*, trois hypothèses principales sont proposées. Tout d'abord, [1] tout comme chez *P. aeruginosa*, le *quorum sensing* contrôle la production de rhamnolipides chez *B. thailandensis*. Ensuite, [2] les deux opérons *rhl* ne sont pas transcrits à un niveau équivalent et une stimulation croisée existe entre les deux. Enfin, [3] HmqR agit comme répresseur important de la production de rhamnolipides mais pas *via* l'opéron des HMAQ. Les axes de recherches présentés serviront à vérifier ces hypothèses.

#### 1.5.2. Les objectifs et axes de recherche

Le premier objectif du projet a été de mieux analyser les séquences génétiques des deux opérons rhl afin d'expliquer pourquoi leur niveau de transcription pourrait être si différent. Pour ce faire, les trois gènes rhl ainsi que les séquences promotrices complètes ont été comparées entre les deux opérons mais également avec d'autres espèces qui se révélaient posséder de telles séquences. Les régions promotrices ont été analysées pour la formation d'éventuelles structures secondaires ou repliements particuliers.

Le deuxième axe de recherche consistait à vérifier l'implication de chaque système de QS dans la régulation de la production de rhamnolipides. Tous les mutants simples et multiples du QS, c'est-à-dire dans les synthases Btal et les régulateurs BtaR (type LuxR) et HmqR (type LysR), ont été analysés pour leur production de rhamnolipides, comparativement à la souche sauvage.

Le troisième objectif visait à déterminer le niveau de transcription de chaque opéron rhl dans la souche sauvage. Différents rapporteurs transcriptionnels de type fusion-lacZ ont été élaborés pour chacun des opérons et transférés chez B. thailandensis. La production de  $\beta$ -galactosidase a alors été suivie chez la souche sauvage mais également chez les mutants polaires simples  $\Delta rhlA$  et chez certains mutants du QS.

Les deux derniers axes de recherche répondaient au même objectif : identifier des molécules régulatrices, directes ou indirectes, des opérons *rhl*. Le premier axe s'appuyait sur un criblage après mutagénèse aléatoire par transposon des rapporteurs *lacZ* précédemment créés et transférés chez la souche sauvage. Le deuxième et dernier axe de recherche suivait une approche plus ciblée puisqu'elle consistait en un *pull-down* des molécules contenues dans le milieu (intra et extra-cellulaire) par les régions promotrices fixées sur des billes magnétiques.

Chapitre II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

# II.1. SOUCHES BACTÉRIENNES, PLASMIDES, ET CONDITIONS DE CULTURE

## II.1.1. Souches bactériennes et plasmides

La grande majorité des expériences menées pour cette étude ont été réalisées avec la bactérie *Burkholderia thailandensis*, et plus précisément la souche E264 isolée par l'équipe de Donald Woods en Thaïlande (Brett *et al.*, 1998) et dont le génome a été séquencé en 2005 (Kim *et al.*, 2005). Toutes les souches bactériennes, ainsi que les divers mutants de *B. thailandensis* utilisés, sont présentés dans le Tableau 8. Les plasmides ayant servis pour ces travaux sont énumérés dans le Tableau 9.

Tableau 8 : Liste des souches et des mutants utilisés dans cette étude.

Souche bactérienne	Caractéristiques	Référence		
Burkholderia thailandensis E264		(Brett et al., 1998)		
rhIA1-	Mutation polaire du gène rhlA BTH_II1075 (Tc¹)	(Dubeau et al., 2009)		
rhIA2-	Mutation polaire du gène <i>rhlA</i> BTH_II1881 (Tc <sup>r</sup> )	(Dubeau <i>et al.</i> , 2009)		
btal1-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btal2-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btal3-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btaR1-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btaR2-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btaR3-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btaR4-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btaR5-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
btal1,2,3-	Mutation par échange allélique non-marquée	(Chandler et al., 2009)		
hmqR-	Mutation par transposon mini-Tn5 (Tc')	(Dumais, 2010)		
hmqR-btal1-	Transfert chromosomique par transformation naturelle (Km <sup>r</sup> )	Laboratoire Déziel		
hmqR-btal2-	Transfert chromosomique par transformation naturelle (Km <sup>r</sup> )	Laboratoire Déziel		
hmqR-btal3-	Transfert chromosomique par transformation naturelle (Km <sup>r</sup> )	Laboratoire Déziel		
hmqR- btal1,2,3-	Transfert chromosomique par transformation naturelle (Km <sup>r</sup> )	Laboratoire Déziel		
hmqA-	Mutation polaire par recombinaison homologue (Chl <sup>r</sup> )	(Vial et al., 2008)		
Escherichia coli				
DH5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96	(Manadanah at at 1000)		
	recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)		
SM10 λpir	thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km <sup>r</sup> λpir	(Simon <i>et al.</i> , 1983)		
S17-1	recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 Tmp <sup>r</sup> , Spc <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)		

<sup>=</sup> Marqueurs de résistance :

Ch – Chloramphénicol ; Km – Kanamycine ; Tc – Tétracylcine ; Tmp – Trimethoprime ;

Spc - Spectinomycine; Str - Streptomycine

Tableau 9 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pGEM®-T Easy	Vecteur linéaire avec une séquence de plusieurs thymidine ainsi que le gène <i>lacZ</i> pour faciliter le clonage de fragment PCR, Cb <sup>r</sup> (vecteur pour clonage T/A)	Promega
pAH1	pGEM-prhlA1; Région promotrice de l'opéron I insérée dans pGEM®-T Easy, Cb <sup>r</sup>	Cette étude
pAH2	pGEM-prhlA2; Région promotrice de l'opéron II insérée dans pGEM®-T Easy, Cb <sup>r</sup>	Cette étude
рАН3	pGEM-prhlA1 <sub>541</sub> ; Région promotrice partielle (541 pb) de l'opéron I insérée dans pGEM®-T Easy, Cb <sup>r</sup>	Cette étude
pAH4	pGEM-prhlA1 <sub>353</sub> ; Région promotrice partielle (353 pb) de l'opéron I insérée dans pGEM®-T Easy, Cb <sup>r</sup>	Cette étude
pME6000	pBBR1 <i>ori, lacZ</i> , mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup>	(Maurhofer et al., 1998)
pJPD3	pME6000::BTH_I1403 (hmqR), Tc <sup>r</sup>	(Dumais, 2010)
pTZ110	pBR322 ori, pRO1600 ori, oriT, rep, 'lacZ, bla (Cb')	(Schweizer et Chuanchuen, 2001)
pMCG11	pTZ110::Tmp, Tmp <sup>r</sup>	Laboratoire Déziel
pAH5	pl-lacZ; Fusion transcriptionnelle prhlA1-lacZ, dans pMCG11, Tmp <sup>r</sup>	Cette étude
рАН6	pl <sub>541</sub> -lacZ; Fusion transcriptionnelle prhlA1 <sub>541</sub> -lacZ, dans pMCG11, Tmp <sup>r</sup>	Cette étude
рАН7	pl <sub>353</sub> -lacZ; Fusion transcriptionnelle prhlA1 <sub>353</sub> -lacZ, dans pMCG11, Tmp <sup>r</sup>	Cette étude
рАН8	pll-lacZ; Fusion transcriptionnelle prhlA1-lacZ, dans pMCG11, Tmp <sup>r</sup>	Cette étude
pHBurk3	Contient le transposon HimarBP3, Km <sup>r</sup>	(Rholl et al., 2008)

<sup>=</sup> Marqueurs de résistance :

Les souches bactériennes étaient conservées dans 15% (v/v) de glycérol à -80°C, dans des tubes cryogéniques. Les plasmides étaient quant à eux conservés dans de l'eau milli-Q stérile à -20°C.

# II.1.2. Milieux et cultures

# II.1.2.1. Milieux de culture liquide

Avant toute culture, une préculture en milieu *Tryptic Soy Broth* (TSB, Difco) était réalisée à 37°C, sous agitation dans un tambour rotatif (240 tours par minute), pendant une nuit (O/N). Suite à cela, la

Cb - Carbenicilline; Km - Kanamycine; Tc - Tétracylcine; Tmp - Trimethoprime;

DO<sub>600</sub> était mesurée et un volume précisément calculé servait alors à ensemencer les milieux de culture pour que la DO<sub>600</sub> de départ (DO<sub>1</sub>) soit de 0,05 pour *E. coli*, et 0,2 pour *B. thailandensis*.

Les cultures étaient réalisées, selon l'expérience, en milieu TSB (Difco), en milieu *Nutrient Broth* (NB, Difco) supplémenté de 4% (v/v) de glycérol, ou en milieu minimal M9. Ce dernier était préparé concentré 5X (30 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; 2,5 g·L<sup>-1</sup> NaCl; 15 mg·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>) et stérilisé par filtration (0,2 μm). Juste avant son utilisation, du MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 M filtré) était ajouté pour atteindre une concentration de 0,05 mol·L<sup>-1</sup> dans le milieu 5X. Puis le tout était dilué 1X par ajout d'eau milli-Q stérile. Les cultures étaient soumises à une agitation dans un tambour rotatif (240 tours par minutes) et à 37°C.

Lorsque nécessaire, que ce soit pour la préculture ou pour la culture, les antibiotiques étaient ajoutés après autoclavage des milieux, et avant ensemencement par les bactéries, dans les concentrations indiquées au Tableau 10.

#### II.1.2.2. Milieux de culture solide

Le milieu *Lysogeny Broth* agar (LB agar, 35 g·L<sup>-1</sup>) était utilisé comme milieu solide courant (Wisent). Ce milieu, supplémenté des antibiotiques adéquats après autoclavage, a servi lors des transformations par choc thermique ou par conjugaison.

Pour les suivis de production de  $\beta$ -galactosidase, les milieux solides étaient également constitués de LB agar (Wisent). Après autoclavage, les antibiotiques nécessaires étaient ajoutés (concentrations du Tableau 10) ainsi qu'une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside filtrée (Xgal, 2% w/v) pour atteindre une concentration finale de 40  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> dans la gélose.

Tableau 10 : Concentrations finales d'antibiotiques et de X-gal ajoutées aux cultures liquides ou aux géloses pour E. coli et B. thailandensis, lorsque nécessaire. Valeurs en μg·mL<sup>-1</sup>.

Antibiotiques	Escherichia coli		Burkholderia thailandensis		
Antibiotiques	liquide	solide	liquide	solide	
Tc - Tétracycline	15	-	150	-	
Km - Kanamycine	50	50	50* ou 100	300	
Gm - Gentamycine	-	-	50	50	
Tmp - Trimethoprime	1000	1000	50* ou 100	100	
Cb – Carbenicilline	100	100	-	-	
X-gal	-	40	-	40	

<sup>\*:</sup> Pour les cinétiques de production avec dosage de la β-galactosidase. cf. section II.2.3.

#### II.2. TESTS ET SUIVIS LORS D'UNE CINÉTIQUE

Les cinétiques réalisées au cours du projet avaient deux buts différents. Le premier était de suivre la production de rhamnolipides, et éventuellement de HMAQ, par les différentes souches de *B. thailandensis* utilisées. Le deuxième était de suivre le niveau d'expression de la β-galactosidase chez des bactéries possédant les rapporteurs pl-*lacZ*, pl<sub>541</sub>-*lacZ*, pl<sub>353</sub>-*lacZ* et pll-*lacZ* (*cf.* section II.4.2 pour la construction de ces rapporteurs). La β-galactosidase est une enzyme codée par le gène *lacZ*. Étant donné que ce gène, au sein des rapporteurs, était placé sous le contrôle des mêmes promoteurs que les gènes *rhlA1* et *rhlA2*, le dosage de l'activité de la β-galactosidase reflétait en réalité le niveau de transcription des gènes *rhlA1* et *rhlA2* chez les bactéries ayant ces rapporteurs (i.e. principe de la fusion transcriptionnelle).

Une cinétique durait plusieurs jours chez *B. thailandensis* et 24 h maximum chez *E. coli*. Elle était précédée d'une préculture, comme mentionné dans la section II.1.2.1. En plus des prélèvements effectués régulièrement pour quantifier les rhamnolipides ou l'activité de la β-galactosidase, le suivi de la croissance était également réalisé.

#### II.2.1. Suivi de la croissance

La croissance bactérienne a été évaluée par l'absorbance, ou la densité optique, de la culture à 600 nm (DO<sub>600</sub>). Cette mesure est en fait proportionnelle à la quantité de bactéries présentes dans le milieu (dans la gamme de linéarité de l'appareil utilisé). Grâce au NanoDrop 1000 (Thermo-Fisher), seuls 2 à 3 µL de culture étaient nécessaires pour obtenir cette valeur. Mais par soucis de précision, deux mesures indépendantes pour chaque point de prélèvement ont été réalisées dans chaque expérience. Au besoin, les échantillons pouvaient être dilués, idéalement avec du milieu de culture, ou sinon avec de l'eau milli-Q.

# II.2.2. Suivi de la production de rhamnolipides par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CL/SM)

Sur un échantillon prélevé durant une culture, il était possible de détecter la présence de différentes molécules, de les identifier en connaissant leur masse moléculaire, mais aussi de les quantifier. Pour cela, l'échantillon devait être analysé par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CL/SM).

#### II.2.2.1. Préparation de l'échantillon

Durant la culture, à intervalles réguliers, entre 50 et 400 μL étaient prélevés et placés sur la glace (4°C) pour stopper la croissance bactérienne et l'activité enzymatique. Si nécessaire, dépendamment de la croissance et de la production de rhamnolipides (estimée), des dilutions avec du milieu de culture frais (i.e. non ensemencé) étaient réalisées avant ou après la mesure de la DO<sub>600</sub>. En effet, une trop forte teneur en rhamnolipides avait pour effet de saturer la colonne chromatographique dans l'analyse subséquente. Pour cette raison, il était nécessaire, la plupart du temps, d'effectuer des dilutions, après 24h de culture, des échantillons de *B. thailandensis* (dilutions de 1:2 à 1:400ème pour les plus grands surproducteurs de rhamnolipides).

Ensuite, les prélèvements étaient centrifugés en microtube de 1,5 mL à 10 000 x g pendant 15 min afin que le surnageant, récupéré dans un vial en verre, ne contienne plus de cellules. Le volume de l'échantillon était alors dilué au demi avec l'ajout de méthanol 100%. Puis un volume très précis de standard interne (HHQ-D<sub>4</sub>) était ajouté à l'échantillon pour atteindre une concentration finale précise comprise entre 5 et 10 ppm. L'incorporation de ce standard permettait la quantification des différentes molécules à analyser via l'établissement d'une courbe étalon qui assurait, par la même occasion, la prise en considération de certaines variations apparaissant au fil des injections dans l'appareil. Dans tous les cas, le volume final de l'échantillon ne devait pas être inférieur à 350 μL pour des raisons techniques.

Le vial ainsi préparé était stocké à -20°C dans l'attente de son analyse. Juste avant de passer au CL/SM, l'échantillon était agité afin d'homogénéiser son contenu, puis placé sur les supports de l'appareil chromatographique, dans une chambre maintenue à 4°C.

### II.2.2.2. Principe du CL/SM

L'analyse du contenu d'un échantillon se faisait en deux temps. Tout d'abord, il était soumis à la chromatographie liquide à haute performance (CLHP, ou HPLC en anglais) qui permettait de séparer les molécules en fonction de leur polarité. Pour cela, l'échantillon passait au travers d'une colonne contenant une phase stationnaire hydrophobe (détails section II.2.2.3) à laquelle les molécules étaient adsorbées. Ensuite, grâce aux passages successifs de solvants de polarité décroissante, les molécules étaient éluées. Ainsi, plus la molécule était hydrophobe, plus elle restait adsorbée longtemps sur la colonne. Dans le cas des rhamnolipides, plus la chaîne d'acide gras était longue, plus ce congénère allait être élué tardivement.

La deuxième partie de l'analyse se faisait ensuite en sortie de colonne. Les molécules éluées passaient au fur et à mesure dans le spectromètre de masse (SM). Cet appareil assurait tout d'abord l'ionisation des molécules puis séparait les ions ainsi générés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Connaissant la structure chimique des rhamnolipides et des HMAQ, il est possible de calculer leur masse moléculaire ainsi que les masses des ions pseudomoléculaires générés après ionisation (cf. Tableau 11). Ces masses étant différentes pour chaque congénère, ils pouvaient alors être aisément identifiés dans les spectres de masse résultant de l'analyse d'échantillon par le SM.

Tableau 11: lons pseudomoléculaires correspondant aux principaux congénères de rhamnolipides retrouvés chez B. thailandensis et P. aeruginosa.

Molécule	lon pseudomoléculaire				
Mono-rhamnolipides					
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	447				
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	475				
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	503				
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	531				
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	559				
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	587				
Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	615				
Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	643				
Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	671				
Di-rhamnolipides					
Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	593				
Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	621				
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	649				
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	677				
Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	705				
Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	733				
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	761				
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>	789				
Rha-Rha-C <sub>16</sub> -C <sub>16</sub>	817				

Grâce à l'incorporation, dans l'échantillon de départ, d'un standard interne de masse moléculaire connue et de concentration précise, il était également possible de quantifier les différentes molécules détectées par le spectromètre de masse. Pour chaque composé analysé, le chromatogramme révélait un pic. Pour quantifier ce pic, l'aire sous la courbe était mesurée et comparée à l'aire sous la courbe du standard interne dont la concentration était connue. Grâce à l'établissement, au préalable, d'une courbe de calibration, un facteur de réponse relatif (FRR) avait été calculé pour chaque type de composé (que ce soit des mono ou des di-rhamnolipides) et selon les mêmes conditions expérimentales. Ce facteur

traduisait la relation existant entre une unité d'aire pour le standard interne et une unité d'aire pour le composé. Ainsi, par un simple calcul, il était possible d'obtenir la quantification de l'échantillon :

$$[analyte] = \frac{FRR \times [std] \times Aire_{analyte}}{Aire_{std}}$$

[] = concentration en ppm; FRR = facteur de réponse relatif pour ce type d'analyte; std = standard interne (HHQ-D<sub>4</sub> ici); Aire<sub>x</sub> = Aire sous le pic du composé x.

# II.2.2.3. Paramètres opérationnels de l'appareil

Les composés ont été analysés par un spectromètre de masse triple quadrupole Quattro II (Waters, Mississauga, Ontario, Canada) couplé à un chromatographe liquide haute performance HP 1100 (Agilent Technologies, Saint Laurent, Québec, Canada). Deux colonnes de chromatographie en phase inverse différentes ont été utilisées au fil du projet à cause de problèmes techniques. Ainsi, les premiers échantillons ont été analysés avec une colonne C3 (Agilent Zorbax, 300SB-C3) couplée à une colonne de garde C1 (4,6 mm x 2,0 mm). Les dernières analyses ont été faites sur une colonne C8 (Kinetex, C8 100A) couplée à une colonne de garde C8 (Security Guard ULTRA Cartridges). Dans tous les cas, la chambre de stockage des échantillons du CLHP maintenait les échantillons à 4°C afin de limiter d'éventuelles reprises de croissance bactériennes dans les vials.

Les programmes d'injection ont dû être adaptés selon la colonne. Ainsi, le premier, de 26 min pour la colonne C3, nécessitait l'injection de 10 à 20 μL d'échantillon. Le deuxième, de 20 min pour la colonne C8, ne prenait que 5 μL. Le débit de solvants dans le CLHP était toujours maintenu à 400 μL·min<sup>-1</sup>. Quelque soit le programme utilisé, un gradient eau-acétonitrile contenant 2 mM d'acétate d'ammonium était utilisé.

Le premier programme, prévu pour la colonne C3, faisait passer 25% (v/v) d'acétonitrile pendant les cinq premières minutes, avant d'augmenter le rapport à 50% jusqu'à la 18ème minute, puis 100% d'acétonitrile pendant 3 minutes. Dès la 22ème minute, le mélange de solvants revenait à une concentration en acétonitrile de 25%, et ce jusqu'à la 26ème minute, c'est-à-dire la fin du programme. Le second programme, prévu pour la colonne C8, démarrait par le passage de 100% d'eau pendant 5 minutes. Ensuite, le rapport changeait pour 75% d'acétonitrile pendant 7 minutes, puis augmentait à 90% pendant 1,5 minutes et enfin 100% pendant 3,5 min. Les trois dernières minutes servaient au passage de 100% d'eau dans la colonne.

Pour la détection et la quantification des rhamnolipides, le mode d'ionisation du spectromètre de masse était négatif. La détection des composés se faisait par un balayage des masses comprises entre 130 et 940 Da.

Au fil des analyses réalisées dans ce projet, plusieurs problèmes sont survenus quant à l'utilisation du CL/SM pour la quantification des rhamnolipides. Les colonnes chromatographiques et les colonnes de garde associées ont été bouchées à de nombreuses reprises malgré des échantillons apparemment clairs et non contaminés. Par ailleurs, il est apparu que le standard interne (HHQ-D<sub>4</sub>) ne présentait pas toujours un FRR stable. L'accumulation de ces complications techniques, ajoutés aux changements de colonnes chromatographiques, de méthodes et de programmes associés, a induit des variations non négligeables dans la quantification des rhamnolipides d'une expérience à l'autre. De cette façon, le suivi quantitatif de la production de rhamnolipides, même pour la souche sauvage, n'a pas toujours été très reproductible.

Néanmoins, tous les échantillons d'une même cinétique étant toujours injectés ensemble, comparativement à une souche de référence (généralement la souche sauvage), les observations et conclusions exposées dans ce projet accorderont davantage d'importance à une quantification relative, par rapport à la souche sauvage, plutôt qu'à une quantification absolue en ppm. Pour de futures analyses des rhamnolipides au CL/SM, il serait plus approprié d'élaborer un autre standard interne possédant un FRR plus stable, et dont la sensibilité aux variations d'injection serait la même que les rhamnolipides analysés, par exemple un congénère Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> marqué au deutérium ou au <sup>13</sup>C.

#### II.2.3. Dosage de la β-galactosidase

Le protocole utilisé était celui de Miller, tel que modifié par (Zhang et Bremer, 1995). Toutes les solutions réactionnelles utilisées étaient préalablement acclimatées à la température ambiante. Lors d'un échantillonnage, entre 50 et 100 μL de culture étaient prélevés et la DO<sub>600</sub> était mesurée au NanoDrop. Ensuite, si nécessaire, l'échantillon pouvait être dilué dans du NB + 4% glycérol. Dans tous les cas, le volume réactionnel placé dans le tube servant au test enzymatique était toujours compris entre 20 et 100 μL. Puis ce volume était complété à 1 mL avec du tampon Z (cf. Appendice A). Une goutte de SDS 0,1% (w/v) ainsi que deux gouttes de chloroforme étaient alors ajoutées dans le tube qui était ensuite vigoureusement agité pendant 10 secondes pour lyser les cellules. Après une incubation de 5 min à 30°C, la réaction enzymatique était lancée par l'ajout de 200 μL d'o-nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase (ou ONPG ; 4 mg·mL<sup>-1</sup>) au mélange. Le temps de réaction était calculé à partir de ce

moment et était arrêté par l'addition de 200  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M) lorsque la DO<sub>420</sub> était estimée avoisiner 0,6-0,9 (coloration jaune visible à l'œil nu). La mesure de cette longueur d'onde était réalisée de façon précise grâce au NanoDrop après centrifugation de l'échantillon (1 min, 10 000 x g) afin de précipiter les débris cellulaires. Elle traduisait la libération d'o-nitrophenol durant la réaction enzymatique. Avec les données recueillies, les Unités Miller (UM) étaient calculées selon la formule suivante :

$$Unit\acute{e}s\ Miller = \frac{1\ 000\ \times DO_{420}}{t\times v\times DO_{600}}$$

Dans cette équation, t correspond au temps de réaction enzymatique en minutes, tandis que v traduit le volume de culture utilisé en millilitre. Si l'échantillon prélevé au départ a été dilué avant la réaction, il convient d'en tenir compte et de calculer le volume exact de culture qui a servi au test enzymatique. Par exemple, si un échantillon ayant une  $DO_{600}$  de 4,0 a ensuite été dilué au cinquième pour le test, et que 50  $\mu$ L de cette dilution ont servi pour une réaction enzymatique de 10 min avec une  $DO_{420}$  finale de 0,7, alors :

$$v = \frac{50.10^{-3}}{5} = 10.10^{-3} \text{ mL}$$
 et Unités Miller =  $\frac{1000 \times 0.7}{10 \times 10.10^{-3} \times 4.0} = 1750$ 

# II.3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE CLASSIQUES

#### II.3.1. Extraction d'ADN génomique

Des extractions d'ADN ont été réalisées seulement pour *B. thailandensis*. Suite à une préculture O/N, 500 μL étaient centrifugés dans un tube stérile à 10 000 x *g* pendant 10 min. Après élimination du surnageant, le culot était resuspendu par pipetage dans 400 μL de tampon de lyse (40 mM Tris-HCl; 20 mM NaOAc; 1 mM EDTA; 1% w/v SDS). Ensuite, 132 μL de NaCl (5 M) étaient ajoutés et mélangés doucement par pipetage. Le tube subissait une nouvelle centrifugation à 10 000 x *g*, mais cette fois-ci à 4°C pendant 20 min. Le surnageant était récupéré dans un nouveau tube stérile puis 300 μL de chloroforme lui étaient ajoutés avant de subir une vigoureuse agitation. Après 3 min de centrifugation à 10 000 x *g*, la phase aqueuse (supérieure) était isolée et deux fois son volume en éthanol 95%, ainsi que 1:10ème de son volume en acétate de sodium (3 M), lui étaient rajoutés afin de précipiter l'ADN chromosomique. Le tout était mélangé par inversion et placé à -20°C pour une durée comprise entre 15 min et une nuit. Une nouvelle centrifugation de 20 min à 10 000 x *g* et à 4°C était alors réalisée puis le

surnageant était éliminé. Pour le lavage de l'ADN, 500  $\mu$ L d'éthanol 70% étaient ajoutés au culot, et après centrifugation (2 min, 10 000 x g), étaient éliminés. Le culot était alors laissé à sécher à l'air avant d'être resuspendu dans 100  $\mu$ L d'eau milli-Q stérile.

Après dosage de la concentration en ADN au NanoDrop 1 000 à 260 nm, et vérification de sa pureté (rapport entre l'absorbance à 260 et 280 nm), l'échantillon était dilué avec de l'eau milli-Q stérile pour obtenir une concentration finale de 100 ng·µL<sup>-1</sup>. L'ADN génomique ainsi extrait était stocké à -20°C.

# II.3.2. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique était réalisée à partir de 1 mL de préculture O/N. Après centrifugation (1 min,  $10\ 000\ x\ g$ ), le surnageant était éliminé et le culot était resuspendu dans  $200\ \mu\text{L}$  de tampon P1 (50 mM Tris-HCl;  $10\ \text{mM}$  EDTA; pH 8,0). Puis  $10\ \mu\text{L}$  de RNase A (2 mg·mL<sup>-1</sup>) étaient ajoutés juste avant la lyse des cellules par l'ajout de  $200\ \mu\text{L}$  de tampon P2 ( $200\ \text{mM}$  NaOH;  $1\%\ \text{w/v}$  SDS). Le tout était mélangé doucement par inversion du tube. Après  $2\ \text{à}\ 3$  min, soit le temps que la solution devienne plus homogène,  $200\ \mu\text{L}$  du tampon P3 (3 M KOAc;  $11,5\%\ \text{v/v}$  acide acétique glacial; pH 5,5) étaient ajoutés et l'ensemble était encore une fois mélangé doucement par inversion. Une fois l'ADN génomique ainsi précipité, soit après  $2\ \text{à}\ 3$  min, le tube était centrifugé ( $10\ \text{min}$ ,  $10\ 000\ \text{x}\ g$ ) afin de ne récupérer que le surnageant par pipetage. Un volume équivalent d'isopropanol lui était alors mélangé. Suite à une incubation de 2-3 min, le tout subissait une nouvelle centrifugation (10-15 min,  $10\ 000\ \text{x}\ g$ ). Le culot contenant l'ADN plasmidique, après lavage dans  $500\ \mu\text{L}$  d'éthanol  $70\ \%$  suivi d'une centrifugation ( $2\ \text{min}$ ,  $10\ 000\ \text{x}\ g$ ) et évaporation de l'éthanol résiduel, était resuspendu dans  $50\ \mu\text{L}$  d'eau milli-Q stérile.

Tout comme pour l'extraction d'ADN génomique, la concentration était ajustée, après dosage au NanoDrop à 260 nm, à 100 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup> et l'ADN plasmidique était alors stocké à -20°C.

#### II.3.3. Extraction d'ARN total bactérien

L'extraction d'ARN total a été effectuée avec le kit d'extraction *RiboPure™-Bacteria Kit* d'Ambion sur une culture de 24h de *B. thailandensis hmqR*- en milieu NB + 4% glycérol, selon les consignes du fournisseur. Globalement, les bactéries étaient tout d'abord diluées à une DO<sub>600</sub> de 2,0 (soit environ 1x10<sup>10</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>) dans 4 mL de NB + 4% glycérol à 37°C. Le volume était ensuite divisé en quatre tubes de 1 mL et centrifugé (1 min, 10 000 x *g*). Les surnageants étaient éliminés et les culots étaient resuspendus dans 500 μL de RNA<sub>WIZ</sub> puis lysés par 250 μL de billes de verre (Zirconia Beads fournies avec le kit) sous

agitation mécanique vigoureuse (vortex) pendant 10 min. Les billes et débris étaient ensuite précipités par centrifugation (5 min, 10 000 x g, 4°C) et séparées du lysat bactérien qui était alors supplémenté de  $1/5^{\rm ème}$  de son volume en chloroforme. Après une incubation de 10 min à température pièce, puis une nouvelle centrifugation (5 min, 10 000 x g, 4°C), la phase aqueuse contenant l'ARN total était récoltée.

L'ARN a subi par la suite une purification sur colonne (*RNeasy mini spin column*) ainsi que deux étapes de traitement à la DNase I afin d'éliminer l'ADN résiduel (DNase I de Roche) puis stocké à -80°C. Dans le but de vérifier la pureté de l'ARN total extrait, une PCR classique utilisant les amorces pRhIA1-Bthai et pRhIAR-Bthai a été réalisée (*cf.* Appendice B). Aucune amplification n'ayant été obtenue après 35 cycles, cela confirmait l'absence de contamination par de l'ADN résiduel.

#### II.3.4. Manipulation du matériel génétique

#### II.3.4.1. Couper l'ADN : la digestion enzymatique

Dans cette étude la digestion enzymatique par des enzymes de restriction a eu deux buts principaux : la libération de segments d'ADN pour leur utilisation subséquente dans une construction génétique, ou bien lors de la vérification de plasmide ou de constructions génétiques. Dans les deux cas, le protocole suivi était le même.

Tout d'abord, 19 μL de l'ADN à digérer (100 ng·μL<sup>-1</sup>) était introduit dans un tube à PCR puis 2,5 μL de BSA (1 mg·mL<sup>-1</sup>) ainsi que 2,5 μL de tampon de ligation adapté aux enzymes sélectionnées (10X, NEB) étaient ajoutés. Enfin, au dernier instant, de 0,5 μL à 1 μL de la (des) enzyme(s) nécessaire(s) étaient rajoutés dans le tube, selon que l'enzyme était HF (*High Fidelity* de NEB) ou standard, respectivement. Après le mélange du tube suivi d'une brève centrifugation, le tout était placé à 37°C pour une durée variant de 30 min à 1h30, selon les cas. Il est parfois arrivé qu'une première enzyme soit incubée avec le mélange à 37°C pendant 30 min à 1h avant l'ajout d'une deuxième enzyme et une nouvelle incubation d'une trentaine de minutes.

#### II.3.4.2. Joindre des segments d'ADN : la ligation

Au sein du projet, le but d'une telle manipulation a été, à chaque fois, le clonage, c'est-à-dire l'incorporation d'un segment d'ADN (issu de PCR ou de digestion enzymatique) dans un vecteur ou un plasmide. La méthode était alors toujours la même. Dans un tube PCR étaient mélangés l'ADN à

incorporer, le vecteur ou le plasmide, le tampon de ligation (10X, NEB) et la T4 DNA ligase (NEB). Les concentrations finales, dans un mélange faisant au maximum 50  $\mu$ L, respectaient idéalement le rapport molaire de 1:3 pour vecteur:insert. Le tube était ensuite incubé à température pièce pour 2h ou à 4°C O/N.

La plupart du temps, 10  $\mu$ L des produits de ligation étaient ensuite directement utilisés pour un transfert chez *E. coli* par choc thermique.

#### II.3.5. Transfert d'ADN dans les cellules bactériennes

Le transfert de matériel génétique consiste à incorporer, dans une cellule, de l'ADN étranger tel que des constructions plasmidiques ou parfois, des fragments de génomes entiers. Il permet souvent d'étudier la fonction d'un gène ou sa régulation, mais il peut également servir à la production de grandes quantités de molécules recombinantes. Il existe trois processus différents pour ces transferts de matériel génétique : la transformation, la conjugaison et la transduction. Pour ce projet, seuls les deux premiers ont été utilisés.

## II.3.5.1. Transformation d'E. coli par choc thermique

La transformation est la méthode de transfert d'ADN la plus simple. Elle consiste à introduire de l'ADN étranger directement dans la cellule par un moyen physique ou chimique. Le mode de transformation utilisé dans cette étude pour les souches d'E. coli a été celui du choc thermique. Mais avant de subir une telle transformation, les cellules devaient être conditionnées. Pour cela, les bactéries issues d'une préculture étaient diluées à  $DO_i$  de 0,05 pour une culture en TSB. Après quelques heures, lorsque la  $DO_{600}$  atteignait 0,5, 1 mL était prélevé et centrifugé à 8 000 x g pendant 1min. Le surnageant était éliminé et le culot était délicatement resuspendu dans 500  $\mu$ L de  $CaCl_2$  froid (50 mM) par un pipetage. Les tubes étaient alors placés à 4°C pendant 10 min puis centrifugés une nouvelle fois (8 000 x g, 1 min). Après élimination du surnageant, les cellules étaient remises en suspension dans 100  $\mu$ L de  $CaCl_2$  froid (50 mM) et placées à 4°C dans l'attente de la transformation.

Pour transformer des bactéries ainsi conditionnées par choc thermique, la procédure était la suivante. Entre 5 et 10 μL d'ADN (100 ng·mL<sup>-1</sup>) ou de produit de ligation (non dosé) étaient ajoutés aux cellules. Le mélange se faisait en tapotant le tube qui était ensuite replacé à 4°C pour 1h environ. Les bactéries subissaient ensuite un choc thermique puisqu'elles étaient placées à 42°C pendant 40

secondes. Puis le tube était immédiatement plongé dans la glace (4°C) pour 2 min avant d'y ajouter 1 mL de TSB. Le tout était transféré dans un tube en verre stérile qui était placé à incuber dans un tambour rotatif (240 tours par minutes) à 37°C pendant 1h. Par la suite, 20  $\mu$ L et 200  $\mu$ L de cette culture étaient étalés sur des géloses LB contenant les antibiotiques de sélection nécessaires. Celles-ci étaient placées à incuber pendant 24 à 48h à 37°C, jusqu'à l'obtention de colonies transformées.

La transformation peut également se faire par électroporation. Cette technique a été essayée sur B. thailandensis mais les résultats (non inclus dans cet ouvrage) ont prouvés que cette bactérie n'était pas une bonne candidate pour cette méthode et que les rendements obtenus par conjugaison étaient bien meilleurs.

# II.3.5.2. Transfert chez B. thailandensis par conjugaison avec E. coli

La conjugaison est un procédé de transfert d'ADN entre une bactérie donatrice (ici, *E. coli*) et une bactérie réceptrice (*B. thailandensis*). Elle nécessite le contact et l'appariement des deux bactéries qui repose sur la présence, chez la bactérie donatrice, du facteur de fertilité (facteur F). Celui-ci permet la synthèse de pili sexuels qui assurent la jonction entre les deux cellules et le transfert d'ADN à sens unique. Dans ce projet, seules les souches *E. coli* SM10 λpir et *E. coli* S17-1 ont été utilisées pour effectuer des conjugaisons avec *B. thailandensis* car, contrairement à *E. coli* DH5α, elles possèdent le facteur F.

Le protocole de conjugaison se déroulait en trois étapes. Tout d'abord, les souches étaient lancées en précultures séparées, éventuellement avec des antibiotiques de sélection si nécessaire, puis transférées en culture TSB sans antibiotique. Lorsque la DO<sub>600</sub> atteignait 0,5 pour chaque souche (donneuse et receveuse), 1 mL de chaque culture était prélevé et centrifugé à 8 000 x g pendant 3 min. Le surnageant était éliminé par pipetage et les deux culots étaient récupérés conjointement dans 100 μL de NaCl 0,8% (w/v) stérile. Ces 100 μL contenant les cellules d'*E. coli* et de *B. thailandensis* étaient déposés, sans être étalés, sur une gélose LB ne contenant aucun antibiotique. Après 24h d'incubation à 30°C ou 37°C (selon les expériences), le tapis bactérien était récolté avec une pipette pasteur stérile légèrement recourbée à la flamme, puis resuspendu dans 2 mL de TSB. Ensuite, cinq dilutions sérielles étaient effectuées dans du TSB afin que le bouillon d'origine soit moins dense. 100 μL des trois dernières dilutions étaient alors étalés sur des géloses LB contenant les antibiotiques de sélection et de la gentamycine à 50 μg·mL<sup>-1</sup> afin d'éliminer les cellules d'*E. coli*. Seules les souches de *B. thailandensis* 

ayant incorporé l'ADN de transfert ont ainsi formé des colonies sur les géloses après 48 à 72h d'incubation à 37°C.

## **II.4.** ÉTUDES SUR LA TRANSCRIPTION DES OPÉRONS

Dans le but d'étudier la transcription des opérons lors de cinétiques avec diverses souches de *B. thailandensis*, la création de rapporteurs de type fusion-*lacZ* s'est révélée nécessaire. Cependant, les régions intergéniques en amont des gènes *rhlA1* et *rhlA2* étant particulièrement conséquentes (997 et 572 pb respectivement) et présentant des portions de fortes similitudes, une expérience supplémentaire a été réalisée afin de déterminer les sites d'initiation de transcription des deux gènes. Il s'agit de la technique du 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).

### II.4.1. Identification de site(s) d'initiation de la transcription : 5'RACE

Le kit utilisé a été le 5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends, version 2.0 d'Invitrogen. Le protocole suivi était celui recommandé par le fournisseur. De façon générale, après extraction de l'ARN total bactérien tel que décrit à la section II.3.3, seuls les ARNm des gènes d'intérêt (rhlA1 et rhlA2) étaient rétro-transcrit en ADNc simple brin grâce à l'amorce spécifique Bt-rhlA5'RACE-GSP1 (cf. Appendice B) et à la transcriptase inverse SuperScript™ II (cf. Figure 14, étapes 1 et 2). Il est important de noter qu'étant donné l'exacte similitude des séquences des deux opérons, les ARNm issus du gène rhlA1 ne pouvaient pas être rétro-transcrits séparément de ceux provenant du gène rhlA2. Les ADNc simple brin correspondants étaient donc mélangés. Afin de ne pas perturber la suite de l'expérience avec de l'ARN aspécifique, une purification sur colonne ainsi qu'un traitement avec RNase ont été réalisés (cf. Figure 14, étapes 3 et 4).

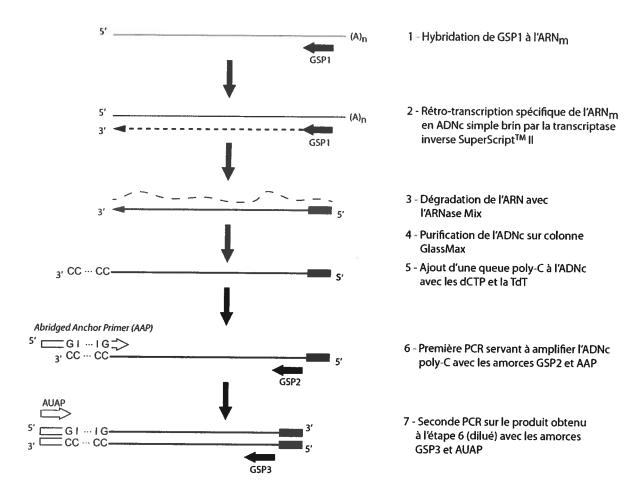


Figure 14: Principe du 5'RACE. Figure adaptée du guide d'utilisation du kit 5'RACE (Invitrogen). GSP1, 2, 3: amorce spécifique de l'ARNm d'intérêt; TdT: transférase déoxynucléotidyle terminale; dCTP: déoxycytidine triphosphate; AUAP: amorce spécifique à la partie 5' de l'amorce Abridged Anchor Primer

Grâce à une transférase déoxynucléotidyle terminale (TdT), une queue poly-C a ensuite été ajoutée aux ADNc pour permettre une amplification subséquente par PCR (cf. Figure 14, étape 5). Les amorces utilisées étaient Bt-rhlA5'RACE-GSP2 (cf. Appendice B) qui est spécifique aux gènes rhlA1 et rhlA2, et l'amorce AAP (5'RACE Abridged Anchor Primer) spécifique à la queue poly-C (cf. Figure 14, étape 6). Finalement, après une dilution au 1:10ème du produit PCR obtenu, une seconde PCR a été effectuée pour augmenter le nombre de copies des ADNc spécifiquement sélectionnés, soit ceux des gènes rhlA1 et rhlA2. Pour cette dernière étape, les amorces utilisées étaient pRhlAR-Bthai et AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) (cf. Figure 14, étape 7).

Les produits de la première et de la seconde PCR du 5'RACE ont été vérifiés sur gel d'agarose 1,5% (TBE) coloré au GelRed. La recette du TBE est disponible dans l'appendice A.

#### II.4.1.1. Clonage des produits du 5'RACE

L'amplification PCR finale a été directement clonée dans le vecteur pGEM®-T Easy (cf. Tableau 9). Le produit de ligation a ensuite été transformé dans E. coli DH5α par choc thermique (cf. section II.3.5.1). Les clones ont été sélectionnés sur des géloses LB contenant de la carbenicilline et du X-gal après 24h d'incubation à 37°C. Les géloses ont par la suite été conservées à 4°C.

#### II.4.1.2. Extraction plasmidique et séquençage

Afin d'identifier les sites d'initiation de la transcription de *rhlA1* et *rhlA2*, 42 des clones obtenus ont été séquencés. Pour ce faire, ils ont tous subi une extraction plasmidique telle que décrite dans la section II.3.2 et ont été envoyé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour y être séquencés avec les amorces SP6 et T7.

#### II.4.2. Création des rapporteurs transcriptionnels de type fusion-lacZ

Le premier objectif était d'élaborer deux rapporteurs différents, contenant chacun la totalité des régions intergéniques en amont des gènes *rhlA1* et *rhlA2*. Pour ce faire, les étapes du processus schématisé dans la Figure 15 ont été globalement suivies avec toutefois quelques variations.

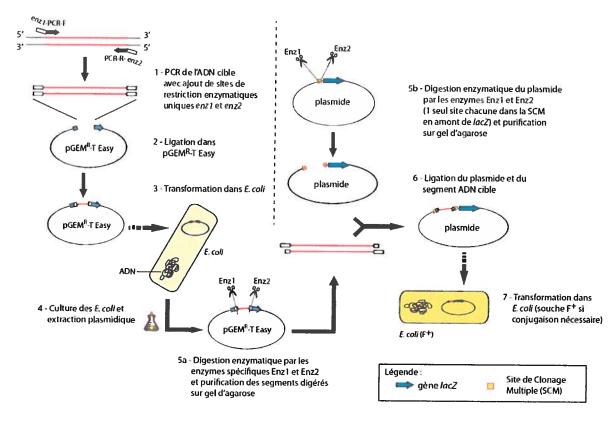


Figure 15: Processus global de la création d'un rapporteur de type fusion-lacZ.

Tout d'abord, deux PCR distinctes ont été réalisées sur l'ADN génomique de *B. thailandensis* avec les amorces sens Thai-UpOp1-F et Thai-UpOp2-F, et la même amorce anti-sens se fixant sur les gènes *rhIA*, Thai-UpOp-R (*cf.* Appendice B). Les deux amorces sens incluaient un site enzymatique *Eco*RI tandis que l'amorce anti-sens ajoutait un site *BamHI* (*cf.* Figure 15, étape 1). Les produits des PCR, de respectivement 1081 pb et 847 pb, incluait tous les deux les 102 premières paires de base des gènes *rhIA*. Ils ont été purifiés sur gel d'agarose avant d'être clonés dans pGEM®-T Easy (*cf.* Tableau 9 et section II.3.4.2; Figure 15, étape 2). Après transformation dans *E. coli* DH5α (*cf.* section II.3.5.1), les clones ayant incorporés les bonnes constructions ont été sélectionnés grâce à leur phénotype blanc sur gélose LB contenant de la carbenicilline et du X-gal (*cf.* Figure 15, étape 3). Les extractions plasmidiques issues de ces clones (*cf.* section II.3.2), après culture en milieu TSB supplémenté de carbenicilline, ont été digérées avec diverses enzymes de restrictions et analysées sur gel d'agarose pour vérifier les constructions et l'orientation du fragment PCR au sein du vecteur pGEM®-T Easy (*cf.* Figure 16). Les vecteurs ainsi créés ont été nommés pAH1 (ou pGEM-p*rhIA1*) et pAH2 (ou pGEM-p*rhIA2*).

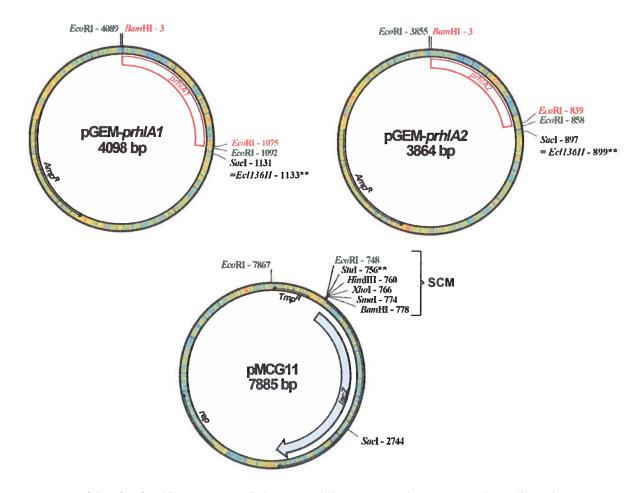


Figure 16: Schéma des plasmides et vecteurs utilisés au cours de la construction des rapporteurs de type fusion-lacZ. En vert : les multiples sites EcoRI présents sur les vecteurs. En rouge : les sites de restrictions ajoutés par PCR aux segments d'ADN clonés. \*\* : enzymes de restriction produisant des coupes franches. SCM : Site de Clonage Multiple.

Le plasmide sélectionné pour construire les rapporteurs était pMCG11 (vecteur réplicatif). En comparant les sites de restriction présents sur les vecteurs pGEM-prhlA et sur le plasmide, il est apparu que BamHI était parfaitement utilisable mais en revanche, il était impossible d'utiliser le site EcoRI car non-unique (cf. Figure 16). L'option choisie pour contourner ce problème a été de sélectionner des enzymes produisant des coupes franches, aussi bien sur les vecteurs que sur le plasmide. Ainsi, en plus de BamHI (NEB), Ecl136II (Fermentas) a été utilisée pour pGEM-prhlA1 et pGEM-prhlA2, tandis que Stul (NEB) a servi à la digestion de pMCG11 (cf. section II.3.4.1).

Après purification des inserts et du plasmide pMCG11 digérés, deux ligations en parallèles ont été opérées puis transformées dans *E. coli* SM10 λpir (*cf.* Figure 15, étapes 5 à 7). Plusieurs clones ont

été ensuite sélectionnés sur gélose LB contenant de la trimethoprime et les extractions plasmidiques ont été analysées, par différents profils de digestion, sur gel d'agarose. Ces profils ont permis de confirmer que les inserts avaient été clonés avec une orientation précise dans le plasmide grâce aux extrémités cohésives produites par la digestion par *BamHI*. Les deux rapporteurs ont alors été identifiés pAH5 (ou pI-lacZ) et pAH8 (ou pII-lacZ). Ils ont été transférés indépendamment l'un de l'autre chez *B. thailandensis* par conjugaison (cf. section II.3.5.2.). Les deux souches, possédant chacune un seul rapporteur, ont été isolées sur gélose supplémentée de trimethoprime, de gentamycine, et de X-gal.

Suivant les résultats obtenus avec le 5'RACE, deux autres rapporteurs ont été créés afin d'évaluer l'importance de la totalité de la région intergénique en amont de rhlA1 dans la régulation de la transcription du gène. La région intergénique complète faisant 997 pb, il a été arbitrairement décidé de créer un rapporteur possédant un peu moins de la moitié de cette région, ainsi qu'un rapporteur encore plus court. Pour créer ces nouveaux rapporteurs, la procédure suivie a été la même que précédemment décrite et illustrée à la Figure 15, en utilisant pGEM-prhIA1 comme matrice. Les deux nouvelles PCR ont été réalisées avec les amorces sens UpOpl.541-Bt et UpOpl.353-Bt et toujours la même amorce anti-sens commune, Thai-UpOp-R (cf. Appendice B). Cette fois-ci, le site de restriction apporté par les deux nouvelles amorces a été Stul. Comme le nom des amorces le suggère, les produits PCR étaient respectivement de 541 pb et 353 pb, et incluaient encore une fois les 102 premières paires de base des gènes rhlA. De la même manière que précédemment, ils ont été clonés dans pGEM pour donner pAH3 (ou pGEM-prhlA1<sub>541</sub>) et pAH4 (ou pGEM-prhlA1<sub>353</sub>). Puis, après transfert chez E. coli DH5α, les vecteurs ont été digérés par BamHI et Stul et les inserts purifiés ont été ligués au plasmide pMCG11 digéré avec les mêmes enzymes. Les nouveaux rapporteurs, pAH6 (ou pl<sub>541</sub>-lacZ) et pAH7 (ou pl<sub>353</sub>-lacZ) ont été confirmés par PCR après transfert dans E. coli SM10 λpir, et avant conjugaison avec B. thailandensis. Tout comme pour les premiers rapporteurs, les deux souches possédant pl<sub>541</sub>-lacZ et pl<sub>353</sub>-lacZ ont été isolées sur gélose supplémentée de triméthoprime, de gentamycine, et de X-gal.

## II.4.2.1. Conditions de culture des rapporteurs pour les cinétiques

Pour les précultures des souches contenant les rapporteurs, que ce soit pour *E. coli* ou pour *B. thailandensis*, le TSB était toujours additionné de triméthoprime aux concentrations indiquées en section II.1.2.2.

Pour les cultures subséquentes, une expérience a révélé que pour des cinétiques de plus de 24h, l'ajout de triméthoprime à une concentration de 50 µg·mL<sup>-1</sup> était nécessaire au maintien des rapporteurs

dans les cellules (résultats non inclus dans ce mémoire), une concentration supérieure affectant légèrement la croissance.

# II.5. MÉTHODES D'IDENTIFICATION DES RÉGULATEURS DIRECTS ET INDIRECTS DES OPÉRONS

# II.5.1. Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production de rhamnolipides

### II.5.1.1. Mutagénèse aléatoire par transposon

Afin de générer une banque de transposants aléatoire dans les souches de *B. thailandensis* portant les rapporteurs transcriptionnels pl-lacZ et pll-lacZ, une conjugaison a été effectuée avec la souche *E. coli* S17-1 portant le transposon *HimarBP3* sur le plasmide pHBurk3 (cf. Figure 17).

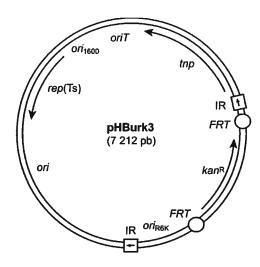


Figure 17: Plasmide pHBurk3 portant le transposon HimarBP3 entre les séquences répétées inversées (IR).  $kan^R$ : gène de résistance à la kanamycine (nptII). ori: origine de réplication pour E. coli;  $ori_{1600}$ : origine de réplication pRO1600 nécessitant la protéine de réplication codée par rep(Ts) et qui confère la thermosensibilité du plasmide chez B. thailandensis à 37°C et plus; oriT: origine de type RK2 pour le transfert du plasmide par conjugaison;  $ori_{RGK}$ : origine de réplication R6K dépendant de la protéine  $\pi$ ; tnp: gène de la transposase; FRT: sites pour l'excision de la cassette de résistance par la flipase. Tiré de Rholl et al. (2008)

Ce plasmide a tout d'abord été extrait d'une préculture d'*E. coli* DH5α en milieu TSB supplémenté de kanamycine. Cette bactérie étant incapable de conjuguer, pHBurk3 a été transféré chez *E. coli* S17-1 qui, ne possédant naturellement pas de résistance à la kanamycine, a ensuite été sélectionné par cet antibiotique sur gélose LB (*cf.* section II.3:5.1).

Le plasmide pHBurk3 possède, en plus d'un gène de résistance la kanamycine, un gène codant pour une protéine de réplication thermosensible. Grâce à cette particularité, pHBurk3 ne peut pas se

répliquer dans *B. thailandensis* quand celle-ci est cultivée à 37°C et plus. Pour cette raison, la conjugaison entre *E. coli* S17-1 et *B. thailandensis* portant un rapporteur a été réalisée à 30°C. Durant cette conjugaison, la transposase, codée par le gène *tnp*, a assuré la transposition d'*HimarBP3*, délimité par les séquences répétées inversées, n'importe où dans le génome de *B. thailandensis*.

Après récupération du tapis de conjugaison et cinq dilutions sérielles, du glycérol a été ajouté aux produits de conjugaison pour produire des aliquots de 1 mL (15% glycérol), lesquels ont été conservés à -80°C.

### II.5.1.2. Méthode de criblage et sélection de transposants

Les transposants ont été sélectionnés sur de grandes géloses LB (20 x 20 cm) contenant de la gentamycine, de la kanamycine, de la triméthoprime et du X-gal (cf. section II.1.2.2 pour les concentrations). La gentamycine permettait de sélectionner contre les souches d'E. coli donneuses de pHBurk3, tandis que la kanamycine et la triméthoprime assuraient la sélection de souches de B. thailandensis possédant à la fois le transposon (Km') et le rapporteur transcriptionnel (Tmp'). Enfin, le X-gal servait à suivre la production de  $\beta$ -galactosidase par les colonies qui poussaient sur la gélose, et ainsi d'effectuer une première sélection. Effectivement, après étalement, avec des billes de verre stériles, de 1 mL des stocks de produit de conjugaisons congelés, l'apparition des colonies et l'évolution de la coloration bleue due au rapporteur ont été suivie lors de l'incubation à 37°C, de 24 à 96h. Les colonies jugées intéressantes ont été sélectionnées et testées en cinétique de 96h sur du milieu NB + 4% glycérol pour leur production en  $\beta$ -galactosidase (cf. section II.2.3), comparativement à la souche sauvage possédant le même rapporteur. Finalement, les transposants jugés différents de la souche sauvage ont été conservés dans 15% de glycérol à -80°C. Les différents critères de sélection des souches seront expliqués à la section III.4.2.1.

# II.5.1.3. Identification du site d'insertion des transposons par PCR doublerondes et séquençage

Pour identifier le site d'insertion du transposon dans le génome, le protocole de PCR double ronde semi-arbitraire développé par Jacobs et collaborateurs a été utilisé (Jacobs et al., 2003). Cette technique consiste en l'utilisation d'amorces spécifiques au transposon couplées à des amorces aléatoires avec étiquette. Deux PCR consécutives ont été effectuées. Les détails des amorces, des réactifs ainsi que des programmes PCR sont énumérés à l'appendice B. Les extractions d'ADN génomique des

transposants ont été utilisées comme matrice pour la première ronde (extractions faites selon la méthode décrite section II.3.1). Lors de celle-ci, l'amorce Bthai\_ronde1\_2 qui se fixe à l'extrémité 3' du transposon a été couplée à trois amorces partiellement aléatoires CEKG2A, CEKG2B et CEKG2C (Jacobs et al., 2003; Liang et al., 2008). Ces dernières amorces contiennent une queue identique permettant l'hybridation subséquente avec CEKG4. Plusieurs fragments ont été amplifiés correspondant à une portion du transposon suivi du chromosome adjacent. Pour augmenter le nombre de copies spécifiques des fragments correspondant au transposon et au génome, une deuxième PCR a été effectuée en utilisant l'amplification PCR de la première ronde comme matrice. L'amorce Tn-pHBurk1-Top se fixait plus près de l'extrémité de la région 3' du transposon que la Bthai\_ronde1\_2 (Liang et al., 2008). La deuxième amorce utilisée, CEKG4, s'hybridait sur la queue des amorces partiellement dégénérées permettant ainsi l'amplification d'un fragment un peu plus court, spécifique au transposon et au bout adjacent du génome (Jacobs et al., 2003). Les produits PCR ont ensuite été visualisés sur un gel d'agarose 1,5% coloré au GelRed (Life Technologies) sous les rayons ultra-violets.

Pour faciliter le séquençage, les produits de PCR ont été traités avec de l'ExoSAP-IT® (USB®). Ce produit contient une exonucléase I et une phosphatase alcaline. Ces deux enzymes dégradent les nucléotides ainsi que les amorces qui n'ont pas été hybridées tout en conservant les fragments de PCR intacts. Puisque les quantités d'amorces et de nucléotides étaient très élevées pour ces PCR, la quantité d'ExoSAP-IT® et les temps d'incubation ont été modifiés. Pour le séquençage, 10 µl du produit final était traité avec 4,5 µl d'ExoSAP-IT®. Suite à l'ajout du produit, une incubation de 20 min à 37°C ainsi qu'une inactivation de 15 min à 80°C ont été effectuées. Ce produit ne nécessitait pas de colonne d'affinité, ce qui permettait de garder tous les produits de PCR obtenus. Ainsi, le rendement du séquençage était grandement amélioré. Ce dernier a été effectué par le Service de séquençage de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).

# II.5.2. Pull down de molécules régulatrices par les régions promotrices fixées sur des billes magnétiques

#### II.5.2.1. Préparation des billes magnétiques avec l'ADN

Quatre lots de billes magnétiques ont été créés. Le premier portait la région intergénique en amont de l'opéron 1 tandis que le deuxième portait celle de l'opéron 2. Les deux derniers lots portaient les régions écourtées, de 541 pb et 353 pb respectivement, comme témoin négatif pour l'expérience. Les

billes magnétiques étant recouvertes de streptavidine (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Invitrogen), les ADN devaient inclure une extrémité biotinylée pour s'y fixer naturellement. Pour ce faire, les quatre régions intergéniques ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique de *B. thailandensis* grâce aux amorces sens pRhlA1-Bthai, pRhlA2-Bthai, UpOpl.541-Bt et UpOpl.353-Bt, et à l'amorce anti-sens commune biotinylée à l'extrémité 5', pRhlAR-Bthai.biot (*cf.* Appendice B). Après purification sur gel d'agarose, les concentrations ont été ajustées à plus de 150 ng·μL<sup>-1</sup> et les segments d'ADN ont ensuite été stockés à -20°C.

En parallèle les billes magnétiques ont été préparées selon les recommandations du fournisseur. Celles-ci (400 μL) ont été réparties de manière égale dans quatre tubes, eux-mêmes accolés à un aimant. Ainsi, après 2 min, le surnageant a pu être pipeté et éliminé sans enlever de billes. Une fois l'aimant éloigné des tubes, les billes ont été resuspendues dans 100 μL de tampon B&W 1X filtré (cf. Appendice A). Après agitation, les tubes ont été replacés le long de l'aimant et le processus de lavage par le tampon B&W 1X a été répété deux autres fois. Lors d'un dernier lavage, les billes ont finalement été resuspendues dans 100 μL de tampon B&W 2X puis 100 μL de chacun des quatre ADN biotinylés ont été ajoutés indépendamment dans les tubes, suivi de 30 min d'incubation à température pièce, en mélangeant de temps en temps. Suite à cela, trois nouveaux lavages avec 100 μL de tampon B&W 1X ont été réalisés. Les quatre lots de billes portant les segments d'ADN des régions intergéniques ont finalement été stockés séparément dans 100 μL de tampon B&W 1X à 4°C jusqu'à leur utilisation.

#### II.5.2.2. Extractions protéiques

Deux extractions protéiques (fractions solubles intracellulaires et membranaires) ont été réalisées sur des cultures de *B. thailandensis* en milieu TSB d'une part, et en milieu NB + 4% glycérol d'autre part, le tout sans antibiotique (4 x 100 mL, 34°C, agitation 240 rpm, dans les deux cas). Pour une extraction, lorsque la DO<sub>600</sub> était comprise entre 6 et 10, la culture était arrêtée pour que les protéines soient extraites. Pour ce faire, la culture a d'abord été répartie dans des tubes à centrifugation de 50 mL préalablement stérilisés à l'éthanol sous hotte biologique. Le surnageant a été éliminé après une centrifugation de 10 min à 10 000 x g, et les culots ont été conjointement repris dans environ 2 x 50 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Ils ont à nouveau subi une centrifugation de 10 min à 10 000 x g puis finalement resuspendus, après élimination du surnageant, dans un total de 13 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Une tablette contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Complete Mini*, Roche Applied Science) a été dissoute dans la solution de protéines concentrées obtenue avant sonication pour lyser

les cellules (6 x 30s, à 3%). Le lysat bactérien a ensuite été réparti dans sept tubes pour être centrifugé 10 min à 18 000 x g. Le surnageant a alors été récupéré pour subir une ultra-centrifugation (Optima L-100K, Beckman, supports SW41 Ti) de 40 000 rpm pendant 30 min à 4°C. Ensuite, 10 mL de tampon de conservation de protéine 2X (cf. Appendice A) ont été mélangés aux 10 mL de surnageant récoltés. La concentration en protéines totales a été mesurée par dosage de Bradford (courbe d'étalonnage sur la BSA) et des aliquots de 1 mL ont finalement été stockés à -80°C. Avant l'utilisation des aliquots, étant donné les trop faibles concentrations en protéines obtenues, les échantillons ont été concentrés 2X par évaporation (Labconco Centrivap Concentrator, 45°C pendant 2h).

# II.5.2.3. Pull down, séparation et identification des molécules piégées par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Le *pull-down* consistait à mettre en contact les extractions protéiques avec les différents lots de billes magnétiques. Plusieurs couples « ADN-protéines » ont donc été testés, tel que résumé au Tableau 12.

Tableau 12 : Couples « ADN-protéines » testés durant l'expérience de pull-down.

ADN Protéines	prhIA1	prhlA2	prhlA1 <sub>541</sub>	prhlA1 <sub>353</sub>
Issues de TSB	TSB-I	TSB-II	TSB-I <sub>541</sub>	TSB-I <sub>353</sub>
Issues de NB + 4% glycérol	NB-I	NB-II	NB-I <sub>541</sub>	NB-I <sub>353</sub>

Pour chaque couple, 50 μL de billes ont été utilisées. Après avoir été débarrassées de leur surnageant, pipeté grâce à l'application de l'aimant, elles ont été resuspendues par l'ajout de 20,5 μL de tampon d'hybridation (cf. Appendice A) et 79,5 μL de protéines concentrées 2X. L'incubation a eu lieu à température pièce pendant 25 min en mélangeant délicatement par pipetage de temps en temps. L'aimant a ensuite été appliqué le long des tubes et après 2 min, le surnageant a été pipeté et éliminé. Les billes ont alors subi trois autres fois l'étape d'hybridation par ajout de tampon et de protéines. Suite à cela, elles ont été lavées par 50 μL de tampon de lavage faible en sel (cf. Appendice A) et transférées dans un nouveau tube. Encore une fois, après application de l'aimant et élimination du surnageant, elles ont à nouveau été lavées et transférées à deux reprises. Finalement, l'étape de rinçage a été effectuée par l'ajout de 25 μL de SDS 0,1% (w/v) et une incubation de 10 min à température pièce suivie de 2 min à 100°C. Le surnageant contenant les protéines éluées a été récupéré dans un nouveau tube et les billes ont été rincées une deuxième fois selon la même procédure.

Au total, 50 µL de protéines éluées ont été récoltés pour chacun des huit couples « ADN-protéines » testés. La totalité de chaque éluat a été déposée sur gel SDS-PAGE 12% (cf. Appendice A). Les protéines ont été séparées par une migration de 18h à 100V et révélées par une coloration au nitrate d'argent. Les bandes jugées intéressantes ont été découpées et ont subi successivement un lavage, une réduction/alkylation et une digestion tryptique selon le protocole détaillé par Hellman et al. (1995). Les fragments protéiques ont ensuite été extraits des bandes, purifiés et injectés pour analyse dans le CL-SM.

# II.5.3. Création de systèmes hétérologues chez E. coli SM10 λpir

Les systèmes hétérologues ont consisté en la co-expression, chez *E. coli* SM10 λpir, des rapporteurs pl-lacZ ou pll-lacZ (cf. section II.4.2) ainsi qu'un plasmide exprimant HmqR. Pour ce faire, les souches *E. coli* SM10 λpir portant les rapporteurs ont été transformées avec le vecteur pJPD3 (cf. Tableau 9) comme décrit à la section II.3.5.1. En parallèle, le vecteur vide pME6000 a également été transféré chez les *E. coli* SM10 λpir portant les rapporteurs afin de servir de témoin négatif.

La cinétique s'est déroulée sur 6h avec des dosages de la β-galactosidase toutes les heures (après 2h de culture). Afin de maintenir les plasmides, les milieux de préculture et de culture (TSB) ont été supplémentés de triméthoprime et de tétracycline dans les concentrations évoquées dans le Tableau 10.

# II.6. ÉTUDES BIOINFORMATIQUES

Toutes les études bioinformatiques menées au sein de ce projet avaient uniquement une visée exploratoire. Pour cette raison, les analyses effectuées, notamment concernant les alignements multiples illustrés par des arbres phylogénétiques, n'ont pas été statistiquement validées.

# II.6.1. Logiciel de comparaison de séquences et établissement d'arbres phylogénétiques

Afin d'identifier les espèces bactériennes possédant des homologues de chacun des trois gènes rhlA, rhlB et rhlC tel que présents chez B. thailandensis, trois BLASTn, trois BLASTp et trois tBLASTn indépendants ont été réalisés sur le site de NCBI, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/. En recoupant tous les résultats obtenus, seules les souches possédant des homologues pour chacun des trois gènes (ou protéines associées) rhlA, rhlB et rhlC, dans chacun des trois types de BLAST, ont été sélectionnées. Les séquences codantes homologues ont ensuite été récupérées et analysées par le logiciel MEGA (Tamura

et al., 2011). Trois fichiers indépendants ont été créés: un pour chaque gène rhl. Les séquences génétiques ont alors été alignées (sans tenir compte des codons) en utilisant MUSCLE (Edgar, 2004), fourni avec le logiciel MEGA, qui a ensuite élaboré trois arbres phylogénétiques selon la méthode Neighbor Joining (NJ), un pour chaque gène rhl.

Chacune des souches de *Burkholderia* présentes (excepté *B. glumae* strain PG1) a été étudiée pour les portions d'environ 10 kpb de leur génome comprenant les trois homologues *rhlA, rhlB* et *rhlC* (au sein d'un opéron ou non). Deux alignements ont été faits avec les opérons entiers de *B. thailandensis*: l'un incluant les régions promotrices, et l'autre sans. Puis deux nouveaux arbres phylogénétiques ont été créés.

Enfin, deux BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) ont été effectués avec les séquences intergéniques complètes prhlA1 et prhlA2.

# II.6.2. Logiciel de repliement de séquences génétiques

L'analyse des repliements possibles de l'ADN des régions intergéniques totales en amont des gènes *rhlA1* et *rhlA2* a été réalisée grâce au logiciel mFold (Zuker, 2003).

#### II.6.3. Prédiction de promoteurs

Plusieurs logiciels ont été utilisés pour prédire l'emplacement de promoteurs au sein des régions promotrices. Les résultats obtenus ont ensuite pu être comparés. Ainsi, les séquences intergéniques complètes (en amont de rhlA1 et rhlA2) ont été analysées individuellement par Neural Network Promoter Prediction (NNPP, http://www.fruitfly.org/seq\_tools/promoter.html), **BPROM** (http://linux1.softberry.com/berry.phtml), par **Prokaryotic Prediction** (PPP. Promoter http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/ppp\_start.php), et enfin par Virtual Footprint v3.0 (http://www.prodoric.de/vfp/vfp\_promoter.php). Pour ce dernier logiciel, il convenait de sélectionner des motifs de boîtes de régulation, préexistants dans la base de données, qui sont supposés se retrouver au sein de la séquence soumise à l'analyse. De cette façon, les analyses mathématiques du logiciel passent par l'utilisation de matrices appelées Position Weight Matrices (PWM). Il y en a une pour chaque motif sélectionné et elles sont construites à partir d'alignements de séquences connues. Ces PWM offrent une méthode sensible pour représenter une similarité avec un motif d'ADN dégénéré tel que les

sites d'ancrage de facteurs de transcription. Pour l'analyse des deux séquences intergéniques, les motifs sélectionnés dans la banque étaient ceux de *P. aeruginosa* (24 au total).

Chapitre III: RÉSULTATS

### III.1. ANALYSES BIOINFORMATIQUES DES SÉQUENCES GÉNOMIQUES

# III.1.1. Études comparatives sur les deux opérons *rhl* de *Burkholderia thailandensis* E264 sans les régions promotrices

Grâce à l'alignement par Emboss (http://www.ebi.ac.uk/) des séquences entières des deux opérons (régions intergéniques en amont non incluses), il a été confirmé qu'il s'agissait bien de deux paralogues identiques à 100%.

#### III.1.1.1. Phylogénie

#### III.1.1.1.1. Pour les gènes rhl individuellement

Comme expliqué dans la section II.6.1, plusieurs souches ont été sélectionnées pour la présence, au sein de leur génome, des homologues des trois gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC*. Grâce au logiciel MEGA, trois arbres phylogénétiques ont ainsi été créés et sont présentés à la Figure 18. Les souches du genre *Burkholderia* y sont les plus nombreuses, mais certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont également présentes.

Au travers des trois arbres, la phylogénie semble plutôt bien conservée, malgré une différence d'échelle évolutive. Les groupes de souches restent les mêmes, et *B. thailandensis* s'avère génétiquement plus proche, pour ses gènes *rhl*, des souches de *B. mallei* et *B. pseudomallei* (Groupe 1 de la Figure 18). Toutefois, il apparaît dans chaque arbre que *B. thailandensis* possède sa propre branche évolutive, même très courte, par rapport aux souches les plus proches.

Par ailleurs, une différence évolutive notable apparaît pour les homologues de *rhlA* par rapport à ceux de *rhlB* et *rhlC*. En effet, alors que le groupe de souches n°1 est évolutivement plus proche du groupe de souche n°2 pour *rhlA*, ce dernier semble être plus proche du group de souche n°3 pour ce qui est des homologues de *rhlB* et *rhlC*.

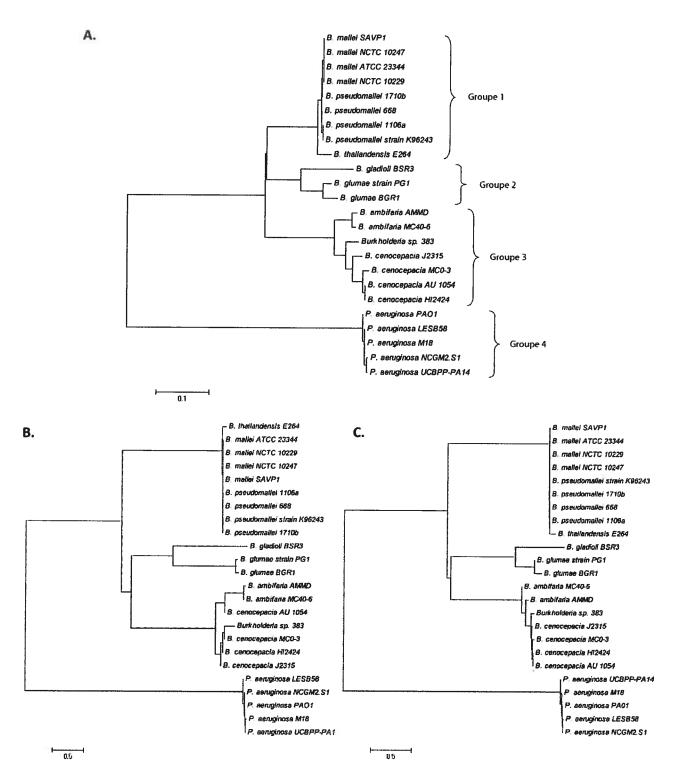


Figure 18: Arbres phylogénétiques créés par le logiciel MEGA sur la base d'alignements MUSCLE des gènes homologues de (A) rhlA, (B) rhlB et (C) rhlC

#### III.1.1.1.2. Pour la totalité des régions comprenant les trois gènes rhl

Chez les souches du genre *Pseudomonas* présentes dans la Figure 18, aucune ne possède les trois gènes *rhl* assez proches dans leur génome. En effet, *rhlC* se retrouve toujours séparé des deux autres gènes et est inclus au sein d'un opéron bicistronique.

En revanche, les souches du genre *Burkholderia* ont toutes révélé que leurs trois gènes *rhl* sont situés au sein d'une région d'environ 8 kpb ressemblant aux opérons trouvés chez *B. thailandensis (cf.* Appendice C pour la visualisation des séquences). Tel qu'attendu et noté précédemment (Dubeau, 2009), *B. pseudomallei* et *B. mallei* possèdent également deux paralogues du même segment de génome. L'exception notable est *B. gladioli* BSR3, qui est phylogénétiquement plus proche de *B. glumae* mais qui lui aussi possède deux copies de la région *rhl*.

Ces régions génomiques ont été extraites depuis le site burkholderia.com (sauf *B. glumae* strain PG1 dont le génome n'est pas disponible sur ce site) et alignées par le logiciel MEGA. L'arbre phylogénétique résultant est présenté en Figure 19. Si une souche possède plus d'une « région *rhl* », ces régions ont été analysées individuellement et portent alors arbitrairement, en plus du nom de la souche, les numéros 1 ou 2.

Les différents groupes identifiés dans la Figure 18 sont bien conservés malgré une augmentation de l'échelle évolutive, probablement due à la taille importante des séquences comparées. Contrairement aux souches des groupes 1 et 2 qui rassemblent les souches possédant respectivement deux ou une seule copie de la « région *rhl* », le groupe 3 est hétérogène dans le sens où l'une des deux souches comprises dans ce groupe ne possède qu'une copie de cette région (*B. glumae* BGR1) alors que la deuxième en possède deux (*B. gladioli* BSR3). Ces deux souches semblent par ailleurs diverger fortement des autres souches.

Cette analyse ne tient pas compte des autres gènes présentant des homologies avec des gènes *rhl* dispersés dans le génome de certaines de ces souches. En effet, quelques unes des bactéries listées possèdent un ou deux gènes supplémentaires codant pour de possibles rhamnosyltransférases. Cependant, n'étant pas compris dans une « région *rhl* » conservée, ces gènes n'ont pas été considérés pour la comparaison.

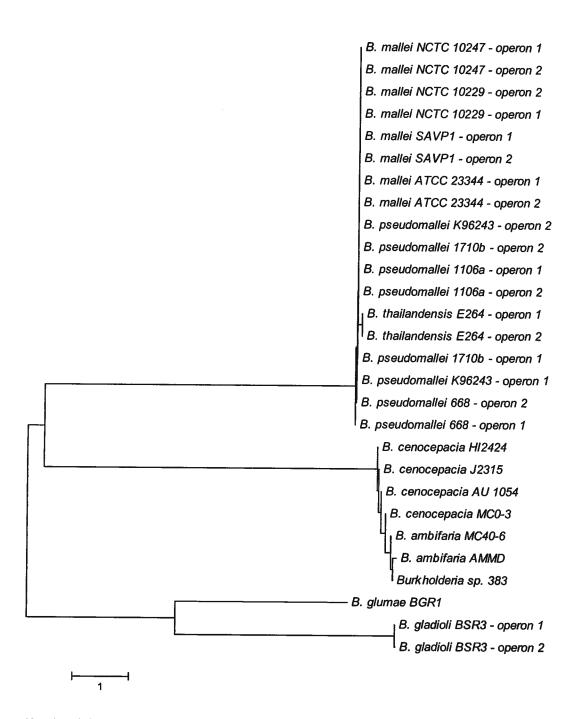


Figure 19: Arbre phylogénétique élaboré par le logiciel MEGA à partir de l'alignement MUSCLE des séquences d'environ 8 kpb homologues aux opérons rhl de B. thailandensis.

### III.1.2. Études comparatives sur les deux opérons avec les séquences promotrices

Un autre alignement a été réalisé avec les mêmes séquences que dans la section précédente mais en incluant les régions intergéniques complètes, directement en amont du premier gène *rhl* (les indications pour les séquences exactes considérées sont précisées dans l'appendice C). L'arbre phylogénétique résultant est montré à la Figure 20.

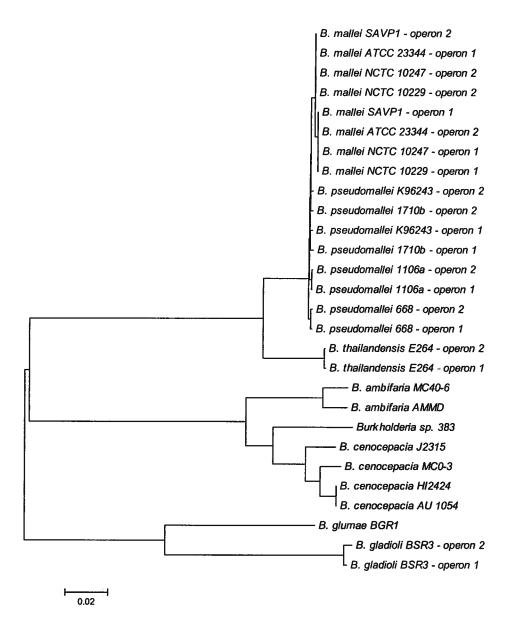


Figure 20 : Arbre phylogénétique élaboré par le logiciel MEGA à partir de l'alignement MUSCLE des séquences homologues aux opérons rhl de B. thailandensis, et incluant les régions intergéniques directement en amont.

Les quatre embranchements principaux aboutissent à la même répartition des souches que lors de l'alignement des séquences sans les régions intergéniques (cf. Figure 19). En considérant l'échelle des deux figures, il apparait que la région promotrice est très bien conservée puisqu'elle permet de réduire les écarts phylogénétiques entre les souches. Cependant, contrairement à l'arbre présenté en Figure 19, B. thailandensis est clairement distinguée des souches les plus proches et semble même aboutir à l'élaboration d'un nouvel embranchement. B. ambifaria semble aussi plus clairement se distinguer de B. cenocepacia.

## III.1.3. Études comparatives des séquences intergéniques seules

# III.1.3.1. Similitudes avec d'autres souches

Afin de vérifier si les régions promotrices pouvaient être analysées par homologie avec des modèles existants, les régions intergéniques en amont des gènes *rhlA1* et *rhlA2* de *B. thailandensis* ont subi un BLASTn dans NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Ici, le but était de vérifier si ces séquences sont retrouvées chez plusieurs espèces ou s'il s'agit de régions promotrices originales, exclusives au genre *Burkholderia*.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 13. Les régions promotrices n'ont donné des correspondances que chez les souches du genre *Burkholderia* qui sont les plus proches de *B. thailandensis* dans la Figure 20, et toujours en amont d'un gène homologue à *rhIA*. Aucune correspondance n'a été trouvée chez une autre espèce.

Il est à noter que 12 des 16 homologies retrouvées correspondent à la région promotrice prhlA2. Ainsi, B. mallei NCTC 10247, B. mallei NCTC 10229, B. mallei SAVP1 et B. mallei ATCC 23344 ne possèdent pas de région promotrice homologue à prhlA1, bien qu'elles possèdent deux « régions rhl ». De plus, pour ces souches, une de leur deux « régions rhl » n'est précédée que des premières 114 pb de prhlA2.

Tableau 13 : Récapitulatif des correspondances rencontrées lors du BLASTn de prhlA1 et prhlA2 de B. thailandensis sur le site de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

			Contexte génomique			Similitude	
	Souche	Gène précédent	Région concernée	Gène suivant	Identité	Gaps	E- value
Correspondances pour prhIA1	B. thailandensis E264	betl (BTH_II1074)	Chromosome II 12511061252102	<i>rhIA</i> (BTH_II1075)	997/997 (100%)	0/997 (0%)	0.0
	B. pseudomallei 1106a	<i>betl</i> (A1835)	Chromosome II 18029811802015	<i>rhIA</i> (A1834)	788/996 (79%)	41/996 (4%)	0.0
	B. pseudomallei 1710b	<i>betl</i> (A0375)	Chromosome II 529245528279	<i>rhIA</i> (A0374)	788/996 (79%)	41/996 (4%)	0.0
	B. pseudomallei K96243	<i>betl</i> (BPSS1353)	Chromosome II 18484621847496	<i>rhIA</i> (BPSS152)	788/996 (79%)	41/996 (4%)	0.0
	B. pseudomallei 668	<i>betl</i> (A1923)	Chromosome II 18690501868084	<i>rhlA</i> (A1921)	786/1000 (79%)	49/1000 (5%)	0.0

42	B. thailandensis E264	'hyp'	Chromosome II	rhIA	572/572	0/572	
pour prhlA2		(BTH_II1882)	22807492280178	(BTH_II1881)	(100%)	(0%)	0.0
1 5	B. pseudomallei 1106a	'hyp'	Chromosome II	rhIA	499/571	5/571	0.0
8		(A0721)	710926711494	(A0723)	(87%)	(1%)	0.0
Ses	B. pseudomallei 668	'hyp'-	Chromosome II	rhlA	498/571	5/571	0.0
dar	b. pseadomaner 000	(A0809)	785285785853	(A0810)	(87%)	(1%)	0.0
Correspondances	B. pseudomallei 1710b	'hyp'-	Chromosome II	rhIA	497/571	5/571	0.0
Tes	b. pseadomaner 1710b	(A2093)	25498352550403	(A2094)	(87%)	(1%)	0.0
ß	B. pseudomallei K96243	'hyp'-	Chromosome II	rhlA	497/571	5/571	0.0
	b. pseddomaner R30243	(BPSS0535)	729880730448	(BPSS0536)	(87%)	(1%)	0.0
		'hyp'-	Chromosome II	+ rhIA	496/571	5/571	0.0
	B. mallei NCTC 10247	(A1996)	19251061924538	(A1995)	(87%)	(1%)	0.0
		orfB +	Chromosome II	+ rhIA	113/114	0/114	5 <sup>e-48</sup>
		(A1424)	13863431386230	(A1423)	(99%)	(0%)	) )
	B. mallei NCTC 10229	'hyp'-	Chromosome II	rhIA	496/571	5/571	0.0
		(1022)	10673241066756	(1021)	(87%)	(1%)	0.0
] ]		orfB+	Chromosome II	rhlA	113/114	0/114	5 <sup>e-48</sup>
		(0183)	168949169062	(0184)	(99%)	(0%)	
	B. mallei SAVP1	'hyp'-	Chromosome II	+ rhlA	496/571	5/571	0.0
		(0726)	736806736238	(0724)	(87%)	(1%)	0.0
		orfB+	Chromosome II	+ rhIA	113/114	0/114	5e-48
		(0464)	472559472446	(0463)	(99%)	(0%)	
	B. mallei ATCC 23344	′hyp′ +	Chromosome II	rhlA	496/571	5/571	
		(BMAA0457)	460762461330	(BMAA0459)	(87%)	(1%)	0.0
		orfB +	Chromosome II	rhlA	113/114	0/114	5 <sup>e-48</sup>
		(BMAA0918)	936274936387	(BMAA0919)	(99%)	(0%)	5

<sup>- :</sup> le début ou la fin du gène est incluse dans la région concernée par la correspondance

<sup>+ :</sup> une portion du génome, en aval ou en amont du gène, n'est pas incluse dans la région concernée par la correspondance

<sup>&#</sup>x27;hyp' : gène codant pour une protéine hypothétique

#### III.1.3.2. Entre les deux opérons de B. thailandensis

L'alignement des deux régions promotrices par Emboss (http://www.ebi.ac.uk/) a révélé certaines similitudes mais également des différences majeures. La Figure 21 illustre le résultat de cet alignement en indiquant plus spécifiquement le pourcentage d'homologie des régions concernées.

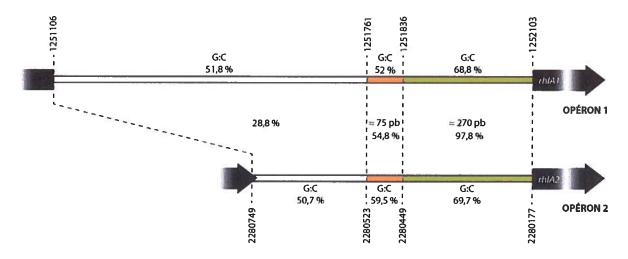


Figure 21 : Schématisation de l'alignement des régions intergéniques en amont des gènes rhIA chez B. thailandensis.

Il est possible de constater qu'environ 270 pb en amont des gènes *rhlA* sont très conservées avec 97,8% d'identité.

Il a également été noté que les séquences intergéniques, dans leur totalité, présentaient des taux de G:C de 56,4 % et 60,8 % en amont de *rhlA1* et *rhlA2*, respectivement. Ceci se trouve être légèrement en-dessous de la moyenne pour le génome complet de *B. thailandensis* E264 qui se situe à 67,6%. Comme le précise la Figure 21, ceci est plus particulièrement dû aux portions en amont des 270 pb précédant directement les gènes, car elles possèdent un taux encore moins élevé avoisinant les 50 %. Dans l'éventualité où cette particularité induise des structures secondaires particulières et solides, une étude des repliements possibles de ces régions a été réalisée.

#### III.1.3.2.1. Repliements possibles des régions intergéniques en amont des gènes rhl

Le logiciel mFold (version 3.5) a été utilisé indépendamment pour le repliement de chacune des régions intergéniques. Les structures présentant la plus faible entropie (ΔG), c'est-à-dire les structures

les plus « solides » et donc, les plus probablement existantes, sont illustrées dans la Figure 22. Elles ont été élaborées à partir des régions intergéniques totales de respectivement 997 pb (prhlA1) et 572 pb (prhlA2). Des repères colorés ont été apposés sur la figure pour distinguer les différentes régions délimitées dans la section précédente.

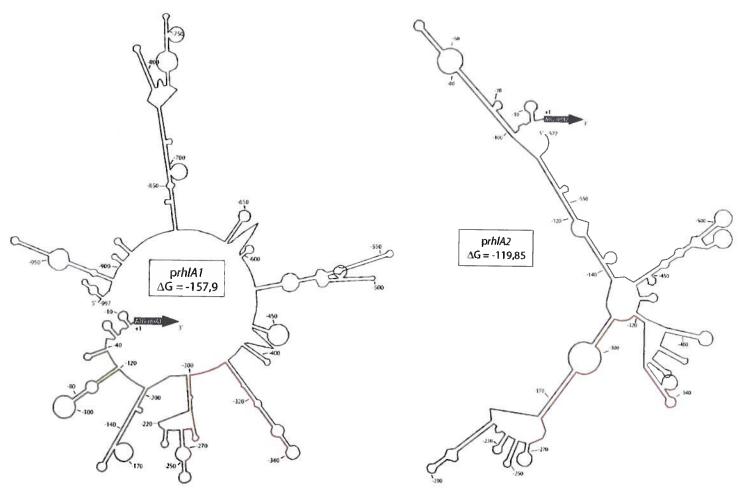


Figure 22: Schématisation des repliements prédits par le logiciel mFold des régions promotrices prhlA1 et prhlA2. En vert : régions d'environ 270 pb présentant 97,8% d'homologie. En orange : régions d'environ 75 pb présentant 54,8% d'homologie.

Malgré la grande similarité des premières 270 pb, les repliements de chacune des régions promotrices ne présentent quasiment aucune ressemblance, exception faite de la toute première boucle (à environ -10 pb). Les différentes régions identifiées dans la section précédente ne permettent pas vraiment d'expliquer la différence de repliement observée.

En fait, celle-ci semble surtout due au fait que la région prhlA2 présente la particularité de s'hybrider sur la quasi-totalité de la séquence. En effet, le logiciel mFold fait ressortir que sur les 997 pb de prhlA1, 104 ne peuvent être impliquées dans aucune structure secondaire, soit 10,4% de la séquence, contre seulement 2,3% pour prhlA2 (13 pb).

#### III.1.4. Prédiction de promoteurs

Puisqu'un des objectifs de ce projet était l'identification des facteurs contrôlant l'expression des opérons *rhl* et la production de rhamnolipides, les promoteurs ont été recherchés par des prédictions bioinformatiques. Les tableaux 14 et 15 présentent les résultats obtenus pour chacun des logiciels utilisés sur les deux séquences intergéniques complètes, *prhlA1* et *prhlA2*.

Les trois premiers logiciels utilisés ont tendance à donner des prédictions relativement similaires. NNPP semble d'ailleurs combiner les prédictions de PPP et BPROM. Virtual Footprint propose davantage de possibilités en retrouvant des motifs spécifiques à des promoteurs de *P. aeruginosa*. Ainsi, contrairement aux autres logiciels, Virtual Footprint est le seul à présenter des motifs dans les dernières 270 pb des séquences, soit juste en amont du gène et dans la zone de similitude des deux séquences. Les motifs alors proposés seraient compatibles avec une régulation par RhIR, un régulateur transcriptionnel du QS de la famille LuxR, contrôlant notamment la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (*cf.* section 1.4).

Malgré la similitude de 97,8% entre les deux séquences sur les 270 dernières pb, un site de reconnaissance pour RhIR n'est présent que pour prhIA1 (par Virtual Footprint). En effet, prhIA2, arborant une cytosine (position 468) au lieu d'une thymidine (position 897 sur prhIA1), ne présente pas un motif compatible avec une régulation par RhIR à cet emplacement.

Tableau 14: Représentations schématiques des promoteurs prédits pour prh/A1 par les logiciels NNPP, PPP, BPROM et Virtual Footprint (cf. section II.6.3). Des crochets numérotés permettent de distinguer des prédictions qui se chevauchent sur la séquence. Soulignement = site prédit d'initiation de la transcription. Pour Virtual Footprint : les motifs reconnus par le logiciel sont indiqués à droite de la séquence en précisant s'ils se trouvent sur le brin codant (+) ou non codant (-).

NINDO	
	PPP
1 CGCGGGACCT TGGTGAGCGC AGCGGGGG AAGCCCGAAG GATTTGGGT 50	1 CGCGGGACT IGGIGAGCGC AGCGGCGGCG DAGCCCGDAG GAWAM
	CGTTCAATCA ATRABABATAA GGGGTTCGAT CGTTCACC
AAGCTTGCGG	
	CGCGCGCGCA TCGCGACGACGCACACACACACACACACACACACACACAC
CGTARREST ASTERAGES STRITCAGES	AAGTGAAAGA GTGTTGAGAA TGT
PARTICORS.	CATTGAAAAT TCATGTTATG GCGCGCCGGA AATGCACCA
GGGTATGAGG TIGAATATCC GITTCGGTGC	AAAATCGCCC TCGATTGGAT
AGTTCGATGG	GTGTATCCCG GTGGGGCGA
ATTGGAGATT TGCTGTTTGG	9999199999
GATTTGCCGT	00000000000
GCCGGCATCC	GARATAT TTCACGCG
	CAATGTTCGG
AAGCGIACAT ICAICAGITI IICGGGGIGA AATAS	AATATTAAAA GTAGTTGAGG
E GETT GESTE	CGCAAAACG CAAGCCGCCG
GAGGCGTCAT GAGAGCGAGA GGCGCTGGAG ACCACGGGCG GAAGACGGCG	GGCGCTGGAG ACCACGGGG BAGGCTCG
	GGGGAGGGTA TOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOT
GAGGCGAIGC GCGGIICCGG CGAGIGGGIA GCCGCTGCGG CGCGCGIGAG	CGAGTGGGTA GCCGCTGCGG CGCGCTGAGA
	CERCOESCO DAGGESCAFO
ATACGCC	ATCAGCTCAT TTGCCGAGCA GATGCGGGAG BUBCACC
	Virtual Footprint
CECCEGALCY TESTIBACCE AGGGGGGGG AAGCCCGAAG	1 CGCGGGACCT TGGTGAGCGC AGCGGCGGG BAGCCCCAAAG GAMAMACCAM
THTTATTGAT CGPTCAATCA ATAAAAAAA GGGGTTCGAT CGTTGCGGG	CGTTCAATCA ATRACACTAA GGGGTTCGAT
	OOT JOSSON TENNESS ENGINEERING
TGTCGACCGT	TOTO BOOK OF THE TOTO OTHER OF THE TOTO OF THE TOTO OF THE TOTO OTHER OTHER OT
201 CGTAAAGGTT AAGTGAAAGA GTGTTGAGAA TGTTTAAAAC GTTTTAATCG 250	TOTAL CONCRETE CONCRETE TOTAL CONCRETE SOUTH SOU
	STANDARD THE ANGLESANGE GIGTEGAGAA
TCGATTGGAT	TCATSTATE GCGCGCCGGA AATGGTCGAT 300
GTGTATCCCG GTGGGGGCAA	PSEINTENSE IISANIAIGO GITTCGGTGC AAAATCGCCC TCBATTGGAT 350
GCAGGAAGGC GGGGTGGCGG	GTTCGATGG CGGATGAATG TGTGCGTGTG GTGTATCCCG GTGGGGCGGG 400
TTTGTGTGAC GGCCGTCTGC	ATTECHATT TGCTGTTTGG GGCGCATATG
TTCTATATCA CAGAAAATAT TTCACGCCA	GATTTGCCGT GCCGGGTTCG
CGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	GCCGGCATCC GAGTGATGCG
TGATGAGTT THOUSENESS ASPERED CARLEGE CARLEGE CO.	TGAATGGGTT
SOURCE STREET STREET STREETS	MACCIACAI IGAIGAGITI TICGGGGIGA AATATIAAAA GIAGITGAGG 650
Greatage commence and an analysis of the contract of the contr	AGGTTGTATT
ACCACGGGG GAAGACGCG	ರತರತತಾತ್ರಕ್ಕ
GTTGTGCCCG GGGGAGCGTA TTGTCGGCC GAGAAAAAAC	GAGGCGTCAT
CGAGTGGGTA GCCGCTGCGG CGCGCGTGAG	GGGTGACCGC GTTGTGCCCCG
GCAGGGGGG CAGATCGCGC GGGAGGGCGG CTACGTGGAG GCGTCCATCA	GAGGCGATGC GCGGTTCCGG CGAGTGGGTA
TTGCCGAGCA GATGCGGAG ATACGCC	CAGATCGCGC GGGAGGGCGG CTACGTGGAG GCGTCCATCA 950
	551 AGGCCCCC ATCAGCTORY ITGCGSAGCA (ATGCCGCAGAG) ATACCCC 997 RAIR(+)/RAIR(-)

Tableau 15: Représentations schématiques des promoteurs prédits pour prhlA2 par les logiciels NNPP, PPP, BPROM et Virtual Footprint (cf. section II.6.3). Des crochets numérotés permettent de distinguer des prédictions qui se chevauchent sur la séquence. Soulignement = site prédit d'initiation de la transcription. Pour Virtual Footprint : les motifs reconnus par le logiciel sont indiqués à droite de la séquence en précisant s'ils se trouvent sur le brin codant (+) ou non codant (-).

	1	TCCCGGCGGG	CGCGCCGATG	CAGCGGCGGC	CGGAACGGTT	CETCECECE	50	
NNPP			CGATAAGAGG					
ź			TTAAGCTTAT					
22		AAGCGG	ATTTTTGAAA	40	RAATCGAAA	-4-		
	201	1				_	M	
1		4		The second secon	GOTGCATOG		250	
	251	Access 10	ACGCGTCGCC					
			AATCCTTCAA					
			GAAGACGGCG					
	10		GGAGAAGGGG					
	()		GCGCGCGCGA					
			TGGAGGCGTC		GCGGGATCAG	CTCATTTGCC	550	
	551	GAGCAGATGC	GGGAGATACG	cc			572	
РРР	1	TCCCGGCGGG	CGCGCCGATG	CAGCGGCGGC	CGGAACGGTT	CGTCGCGCGG	50	
<u>-</u>	51	CGACGGATAG	CGATAAGAGG	GCGATATCGT	TTTCCGGCCT	GCGGGTCCGT	100	
	101	AAATGACCGA	TTAAGCTTAT	CCGAAAATCG	CĄŢATCGACA	TGAŢGĢGAAC	150	
1	151	AAGCGGGTTC		SCOGGTTCAA	AA A BOGAAAA	POSETUTARA	200	
	201	aatstiikea	TEPASGATIC	GATATCTTAT	GCTGCATCGC	AGAATCCTCG	250	
1 1	251	GTTCAATAAG	ACGCGTCGCC	GCACGGTGTA	ATTCGGGCGG	CAAGACGCCG	300	
	301	GGAAGCAGTT	AATCCTTCAA	GAGGCGTCAT	GAGAGCGAGA	GGCGCTGGAG	350	
1 1	351	ACCACGGGCG	GAAGACGGCG	GGGTGACCGC	GTTGTGCCCG	GGGGGAGCGT	400	
	401	ATTGTCGGCC	GGAGAAGGGG	CGAGGCGATG	CGCGGTTCCG	GCGAGTGGGT	450	
[	451	AGCCGCTGCG	GCGCGCGCGA	GGCAGGGCGG	GCAGATCGCG	CGGGAGGGCG	500	
	501	GGCGGCTACG	TGGAGGCGTC	CATCAAGGGC	GCGGGATCAG	CTCATTTGCC	550	
	551	GAGCAGATGC	GGGAGATACG	CC			572	
5	1	TCCCGGCGGG	CGCGCCGATG	CAGCGGCGGC	CGGAACGGTT	CGTCGCGCGG	50	
BPROM			CGATAAGAGG					
8			TTAAGCTTAT					
			ATTTTTGAAA					
			TTTAGGATTC					
			ACGCGTCGCC					
			AATCCTTCAA					
	351	ACCACGGGCG	GAAGACGGCG	GGGTGACCGC	GTTGTGCCCG	GGGGGAGCGT	400	
	401	ATTGTCGGCC	GGAGAAGGGG	CGAGGCGATG	CGCGGTTCCG	GCGAGTGGGT	450	
	451	AGCCGCTGCG	GCGCGCGCGA	GGCAGGGCGG	GCAGATCGCG	CGGGAGGGCG	500	
	501	GGCGGCTACG	TGGAGGCGTC	CATCAAGGGC	GCGGGATCAG	CTCATTTGCC	550	0
	551	GAGCAGATGC	GGGAGATACG	cc			572	
٦	1	TCCCGGCGGG	CGCGCCGATG	CAGCGGCGGC	CGGAACGGTT	CGTCGCGCGG	50	
tprint			CGATAAGAGG					RhlR(-)/PvdS(+)
ఠ			TTAAGCTTAT				150	FleQ(-)/AlgU(-)
빌			ATTTTTGAAA					LasR(-)/PvdS(-)
Virtual Foo			TTTAGGATTC					PvdS(-)/AlgU(-)
🔄			ACCOSTOSCO					
			AATCCTTCAA					AlgU(-)
			GAAGACGGCG					
			GGR GAAGGGG					FleQ(+)
			GCGCGCGCGA					
			TGGAGGCGTC		1	-	550	RhlR(+)/RhlR(-)
	551		SSCAC ATACG				572	
	-						J + 64	

# III.2. EFFET DU *QUORUM SENSING* SUR LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION DES RHAMNOLIPIDES

Le quorum sensing est connu pour contrôler l'expression des gènes codants pour les enzymes de synthèse des biosurfactants chez la plupart des bactéries qui en produisent, en particulier chez P. aeruginosa (Ochsner et al., 1994b). Les résultats préliminaires présentés à la section I.4.3 suggèrent que le QS intervient également chez B. thailandensis pour réguler la production de rhamnolipides. Cela a donc été étudié grâce à plusieurs mutants. Leur production a été suivie lors de cinétiques réalisées en milieu NB + 4% glycérol. Toutes les cinétiques ont été réalisées en triplicata et les analyses en CL/SM ont majoritairement été effectuées grâce à la colonne chromatographique C3 (sauf indication contraire).

## III.2.1. Mutants du système btaRI

Les cinétiques de production de rhamnolipides des différents mutants du système *btaRl* ont été réalisées sur une durée de 10 jours et sont présentées à la Figure 23.

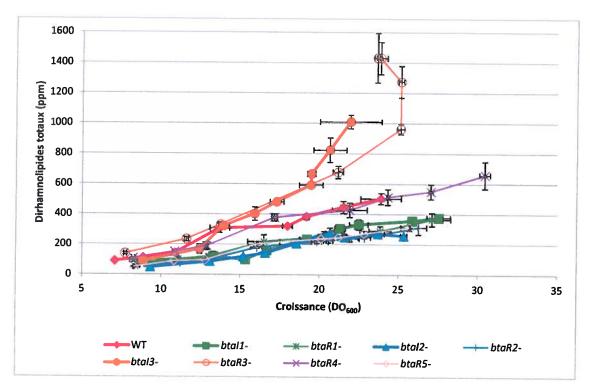


Figure 23 : Cinétique de production de dirhamnolipides totaux par les mutants du système btaRI en fonction de la croissance en milieu NB + 4% glycérol. WT : souche sauvage.

Le système de QS btaRI n'agit pas uniformément sur la régulation de la production de rhamnolipides. Alors que le système btaRI3 semble réprimer fortement cette production, btaRI1, btaRI2 ainsi que BtaR5 ont à l'inverse un effet activateur. BtaR4 n'a apparemment pas d'impact sur la régulation.

Il est également possible de constater que la surproduction de rhamnolipides engendrée par les mutants *btal3*- et *btaR3*- est associée à un ralentissement, voire un arrêt de la croissance. À l'inverse, les sous-producteurs ont tendance à avoir une meilleure croissance que la souche sauvage.

Une autre cinétique a été menée sur le triple mutant *btal1,2,3*- qui ne produit donc aucune molécule de signalisation pour les systèmes de QS *btaRI*. Pour plus de clarté, son profil de production est présenté en Figure 24, en ne le comparant qu'aux profils de la souche sauvage et des mutants simples *btal-*.

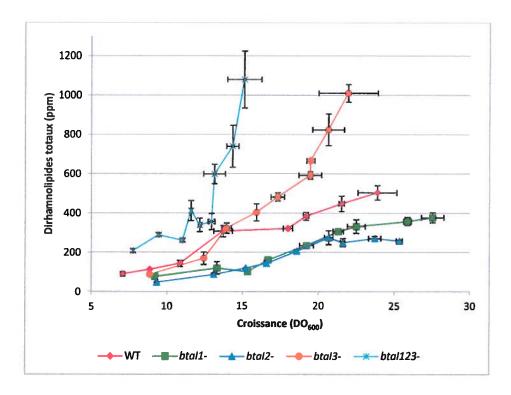


Figure 24: Cinétique de production de dirhamnolipides totaux du triple mutant btal1,2,3- comparativement aux mutants simples btal- et à la souche sauvage, en fonction de leur croissance. WT: souche sauvage.

Ce graphique montre que l'effet global du système de QS *btaRI* est répresseur sur la production de rhamnolipides. L'annihilation complète de la communication par ce système ne conduit pas à une

surproduction aussi importante que pour le mutant *btaR3*- mais reflète un arrêt de la croissance prématuré par rapport à la souche sauvage ou à n'importe lequel des mutants simples.

### III.2.2. Mutants du système des HMAQ

Les deux mutants *hmqR*- et *hmqA*- ont été testés individuellement en comparaison avec la souche sauvage. Le mutant *hmqA*- a subi une cinétique de 6 jours et les rhamnolipides ont été analysés avec la colonne chromatographique C8. Le mutant *hmqR*- a, quant a lui, été évalué sur une durée de 9 jours.

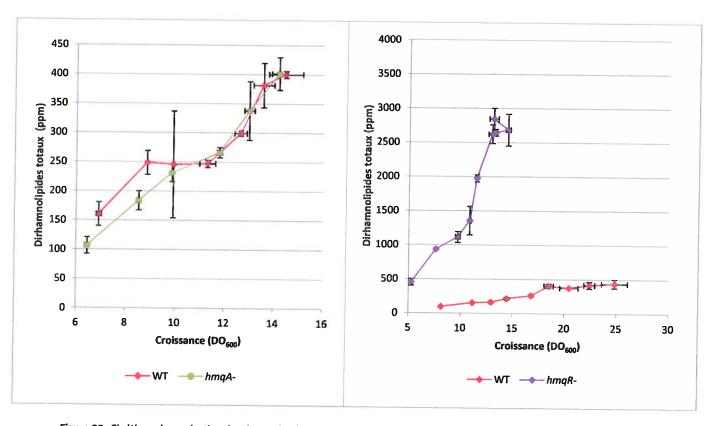


Figure 25 : Cinétique de production des rhamnolipides des mutants hmqA- et hmqR- en comparaison avec la souche sauvage, en fonction de leur croissance. WT : souche sauvage.

L'interprétation de la Figure 25 permet de dire que le système des HMAQ n'intervient pas dans la régulation de la production de rhamnolipides puisque le mutant *hmqA*-, qui ne produit aucun HMAQ, présente un profil de production de rhamnolipides identique à la souche sauvage.

En revanche, le mutant *hmqR*- produit jusqu'à 7 fois plus de rhamnolipides que la souche sauvage. Ceci indique qu'HmqR est un régulateur transcriptionnel qui inhibe fortement la production de rhamnolipides, et ce sans passer par les HMAQ.

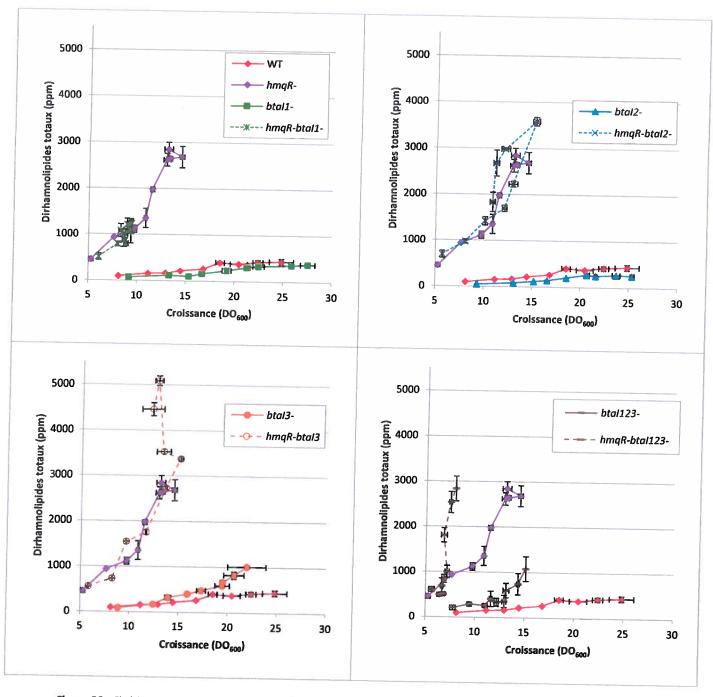
Il est aussi possible de constater que la surproduction de rhamnolipides chez le mutant *hmqR*-s'accompagne une nouvelle fois d'un arrêt prématuré de la croissance.

#### III.2.3. Mutants des deux systèmes de QS combinés

Afin d'évaluer si HmqR agit en amont, en aval, ou en parallèle des autres systèmes connus du QS de *B. thailandensis*, la production des rhamnolipides par des doubles mutants *hmqR-btal-*, ainsi que du quadruple mutant *hmqR-btal1,2,3-*, a été suivie sur 9 jours et est présentée dans la Figure 26. Par soucis de comparaison, les profils obtenus pour les mutants *btal-*, présentés à la Figure 23, sont également affichés.

Chacun des doubles mutants testés présentent une cinétique de production nouvelle, différente de la souche sauvage et des mutants simples. Ceci suggère qu'HmqR agit en parallèle des autres systèmes de QS et que leurs effets respectifs sont alors cumulatifs dans les doubles, ou quadruple, mutants testés.

Encore une fois, les mutants surproducteurs affichent un défaut de croissance important. Le mutant hmqR-btal1- a un profil particulier dû à la mort des cellules en culture. En fait, Btal1, lorsqu'il est muté en plus d'un autre système (btal1,2,3-, hmqR-btal1-, hmqR-btal1,2,3-), semble interférer grandement dans la croissance et la survie des bactéries.



**Figure 26:** Cinétiques de production de rhamnolipides des doubles mutants *hmqR-btal-* et du quadruple mutant *hmqR-btal1,2,3-* en comparaison avec les mutants simples (*hmqR-* et *btal-*) et la souche sauvage, en fonction de leur croissance. WT: souche sauvage.

## III.3. ÉTUDES SUR LA TRANSCRIPTION DES OPÉRONS

## III.3.1. Détermination du site d'initiation de la transcription de chaque opéron par 5'RACE

La technique du 5'RACE a pour but l'identification du ou des site(s) d'initiation de la transcription de gène/opéron. La technique utilisée est décrite à la section II.4.1. Elle a été utilisée sur une extraction d'ARN totaux de *B. thailandensis hmqR-*, choisi pour sa surproduction en rhamnolipides et donc, supposément, sa surproduction en ARNm issus de *rhlA*. Suite aux différentes PCR, un seul fragment a été obtenu, ce qui suggère la présence d'un seul site d'initiation, identique pour l'opéron 1 et l'opéron 2. La Figure 27 représente ces différents fragments. Le produit de la 1ère PCR se situe à environ 370 pb tandis que celui de la deuxième PCR se situe à environ 250 pb. Ces résultats sont cohérents puisque les amorces utilisées pour ces deux PCR sont distantes, sur le gène *rhlA*, de 136 pb. Les produits finaux du 5'RACE ont été clonés dans pGEM®-T Easy et un ensemble de 42 clones, sélectionnés aléatoirement, a été séquencé.

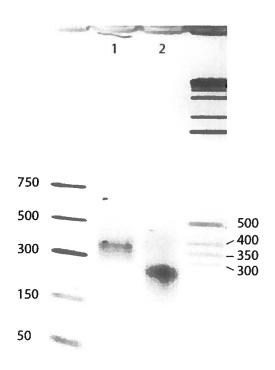


Figure 27 : Visualisation de la première et de la seconde amplification PCR du 5'RACE. Gel TBE 1,5% d'agarose, (1) 10 μL 1<sup>ère</sup> PCR sur ADNc purifié, (2) 10 μL 2<sup>ème</sup> PCR sur les produits dilués de la 1<sup>ère</sup> PCR.

Sept des 42 clones n'ont pas donné de résultat de séquençage concluant puisque les transcrits ne dépassaient pas le site d'initiation de la traduction. Un total de onze longueurs de transcrits différents a été obtenu sur les 35 clones restants, dont deux majoritaires à -59 pb et -37 pb *versus* le site d'initiation de la traduction (ATG). La Figure 28 schématise les résultats obtenus. Seuls quatre transcrits peuvent être assignés de façon certaine à *rhlA1* ou *rhlA2* grâce à la présence d'un segment « GCGG » supplémentaire dans la région promotrice de *rhlA2*.

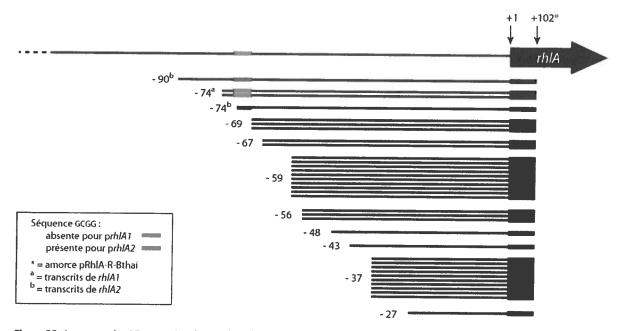


Figure 28 : Longueur des 35 transcrits obtenus lors du 5'RACE comparativement au contexte génomique.

## III.3.2. Cinétiques de la transcription des opérons rhl chez B. thailandensis

#### III.3.2.1. Chez la souche sauvage

Les rapporteurs créés selon la méthode décrite en section II.4.2. ont été transférés individuellement dans la souche sauvage de *B. thailandensis*. Comme témoin négatif, le plasmide pMCG11 vide a également été transféré chez la souche sauvage. Une première cinétique de 4 jours a été réalisée en milieu NB + 4% glycérol sur ces rapporteurs en comparaison avec la souche sauvage (sans rapporteur et donc cultivée sans antibiotique). Les prélèvements ont servi à la fois aux tests de dosage de la β-galactosidase (uniquement pour les souches avec plasmide, *cf.* section II.2.3) et au dosage par

CL/SM de la concentration du rhamnolipide majoritaire Rha-Rha- $C_{14}$ - $C_{14}$ . Les valeurs obtenues sont les moyennes de cinq réplicats de culture (*cf.* Figure 29).

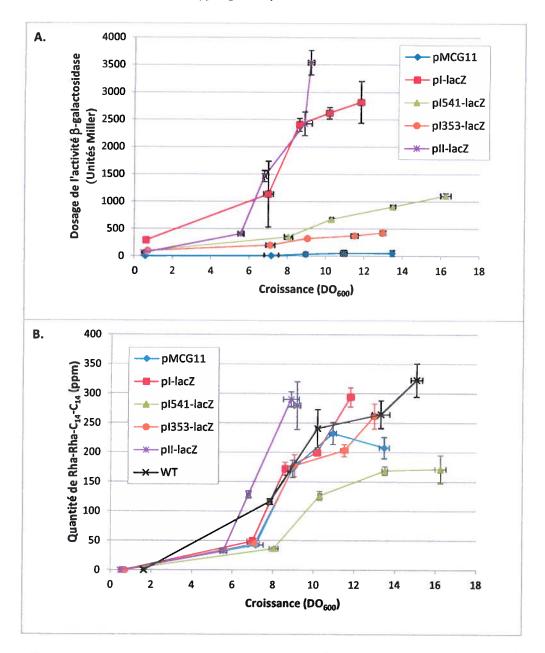


Figure 29: Cinétiques de production de  $\beta$ -galactosidase (A) et de rhamnolipides (B) par les souches de B. thailandensis sauvages supportant les rapporteurs transcriptionnels en comparaison avec la souche sauvage portant le plasmide vide (pMCG11) et la souche sauvage sans plasmide (WT).

Ces premiers résultats ont permis de constater que le plasmide vide ne génère pas de bruit de fond qui puisse interférer dans les analyses.

De plus, les quantités de rhamnolipides détectées, malgré quelques variations dues aux écarts de croissance (pl<sub>541</sub>-lacZ et pll-lacZ), sont semblables pour toutes les souches portant les rapporteurs.

En ce qui concerne les rapporteurs aux régions intergéniques réduites, ils ne sont pas autant transcrits que les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ, soulignant ainsi l'importance de la quasi-totalité de la région intergénique prhlA1 pour une transcription maximale.

Dubeau et al. (2009) avait souligné la différence de production entre les deux opérons chez des mutants simples en révélant que l'opéron 2 semblait aboutir à la production de davantage de rhamnolipides que l'opéron 1. Cela sous-entendait que les deux opérons ne devaient pas être transcrits de la même façon. Les résultats obtenus ici soutiennent cette hypothèse. En effet, en se fiant aux profils d'expression de la  $\beta$ -galactosidase de pl-lacZ et pll-lacZ, il apparaît que le premier est transcrit de façon constante et linéaire, relativement proportionnelle à la croissance, tandis que le second subit davantage une activation au-delà d'un certain seuil de croissance.

Afin de préciser les profils des premières 24h de croissance, une nouvelle cinétique a été réalisée sur 5 jours, uniquement sur les rapporteurs entiers : pl-lacZ et pll-lacZ. Seuls les dosages de la  $\beta$ -galactosidase ont été effectués sur 5 réplicats et sont présentés dans la Figure 30.

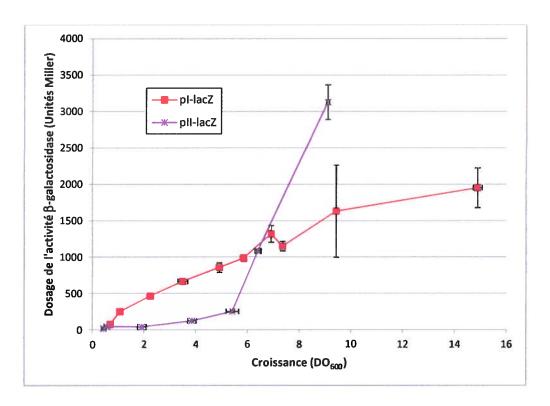


Figure 30 : Cinétiques de production de β-galactosidase par les souches de B. thailandensis sauvages portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ.

Cette nouvelle analyse permet de mieux constater la différence de transcription existant entre les deux opérons *rhl* de *B. thailandensis*. Le premier opéron est transcrit de façon quasi-continue dès le début de la culture comme le prouve le rapporteur pl-lacZ, tandis que l'opéron 2 est sensible à une activation particulière lorsque la croissance dépasse une DO<sub>600</sub> d'environ 5.

Ces mêmes cinétiques ont été répétées plusieurs fois par la suite lors d'expériences sur des mutants ou lors du criblage des transposants (résultats détaillés dans les sections suivantes). Il en est ressorti que le rapporteur pl-lacZ est très instable et son suivi est particulièrement difficile à reproduire. Il a parfois semblé subir une légère activation (comme dans la Figure 29) sans que cela ne soit forcément le cas pour chacun des réplicats testés. Cependant, pl-lacZ a toujours démontré un niveau de transcription de base, en début de cinétique, largement plus fort que pour le rapporteur pll-lacZ, et la tendance s'est toujours inversée en fin de cinétique. Le rapporteur pll-lacZ, en revanche, s'est avéré beaucoup plus reproductible au travers de différentes expériences. Certains défauts de croissance ont pu être constatés à différentes reprises, et ce peu importe les rapporteurs concernés. Néanmoins, les observations décrites ci-dessus ont été maintenues.

## III.3.2.2. Chez certains des mutants du QS

Par manque de temps, les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ n'ont pas été transférés chez tous les mutants du QS étudiés en section III.2. L'étude a donc seulement été menée sur l'un des plus forts sous-producteur de rhamnolipides, le mutant btaR5-, et sur le plus fort sur-producteur, le mutant hmqR-btal3-, ainsi que sur des mutants clés du QS des HMAQ, les mutants hmqA- et hmqR-.

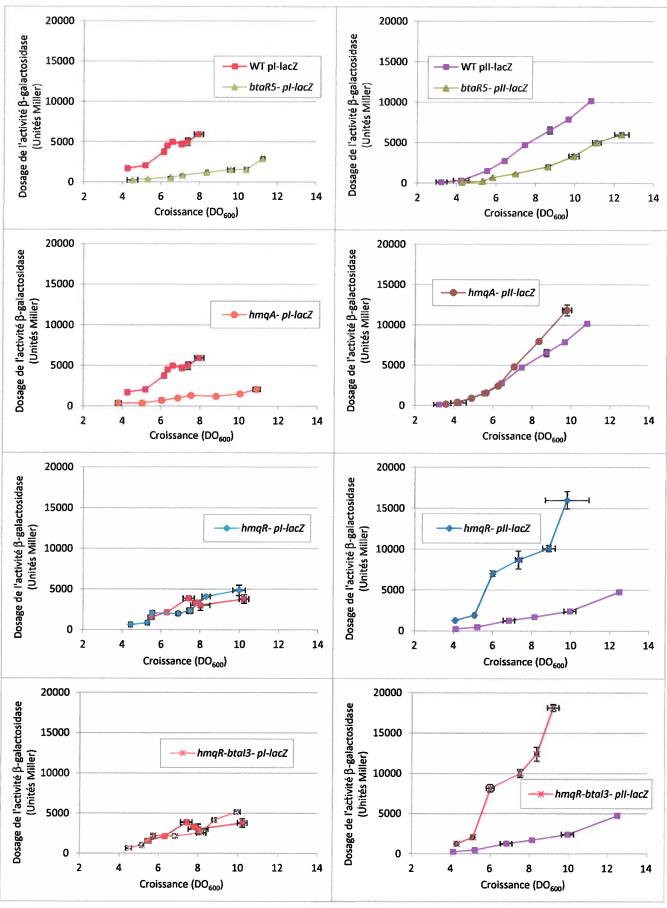
Les cinétiques n'ont pas toutes été réalisées en même temps et se sont déroulées sur 6 ou 7 jours. Les échantillonnages ont été utilisés pour le dosage de la  $\beta$ -galactosidase et pour la vérification des profils de production des rhamnolipides, qui se sont révélés cohérents avec les tests effectués en section III.2. La Figure 31 ne présente que les profils de dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase des rapporteurs dans les quatre mutants comparativement à la souche sauvage. Cela peut également s'interpréter comme étant le niveau de transcription de chaque opéron dans chacun des quatre mutants.

Par rapport au niveau de transcription de la souche sauvage, il apparaît que le mutant *btaR5*-subit une baisse de la transcription des deux rapporteurs, et par conséquent, des deux opérons. BtaR5 agirait donc comme un activateur de ces derniers.

Le mutant polaire *hmqA*-, qui ne produit pas de molécules de signalisation de type HMAQ ni de protéine HmqE, est également affecté dans la transcription des deux opérons : il démontre une forte baisse de la transcription de l'opéron 1, mais à l'inverse, une augmentation de celle de l'opéron 2, surtout en fin de culture.

Les deux autres mutants testés n'ont d'effet que sur un opéron en particulier. En effet, les mutants *hmqR*- et *hmqR-btal3*- ne semblent pas induire de variations sur la transcription de l'opéron 1, par rapport à la souche sauvage, mais affichent une augmentation considérable de la transcription de l'opéron 2.

L'activité de l'opéron *hmq* agirait donc comme activateur de l'opéron 1 et léger répresseur de l'opéron 2, tandis qu'HmqR serait un puissant répresseur de l'opéron 2, possiblement en partie en passant par l'opéron *hmq*. Par déduction, vu les profils du mutant *hmqR-btal3-*, il est également possible de constater que Btal3 ne semble pas agir sur l'opéron 1 mais serait également un répresseur de l'opéron 2 uniquement.



**Figure 31:** Cinétiques de production de  $\beta$ -galactosidase par les mutants btaR5-, hmqA-, hmqR- et hmqR-btal3- de B. thailandensis portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ, en comparaison avec la souche sauvage (WT).

## III.3.3. Étude d'une régulation croisée entre les deux opérons rhi

Dans le but de vérifier si une régulation croisée existerait entre les deux opérons, les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ ont été transférés chez les mutants polaires simples *rhlA1*- et *rhlA2*- de *B. thailandensis* qui ont été suivis en cinétique durant 8 jours.

La Figure 32 présente les profils de transcription (via le dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase) de chacun des opérons dans le mutant polaire pour l'opéron 2 (c'est-à-dire lorsque l'opéron 1 fonctionne seul), ainsi que ceux du mutant polaire pour l'opéron 1 (soit quand l'opéron 2 fonctionne seul).

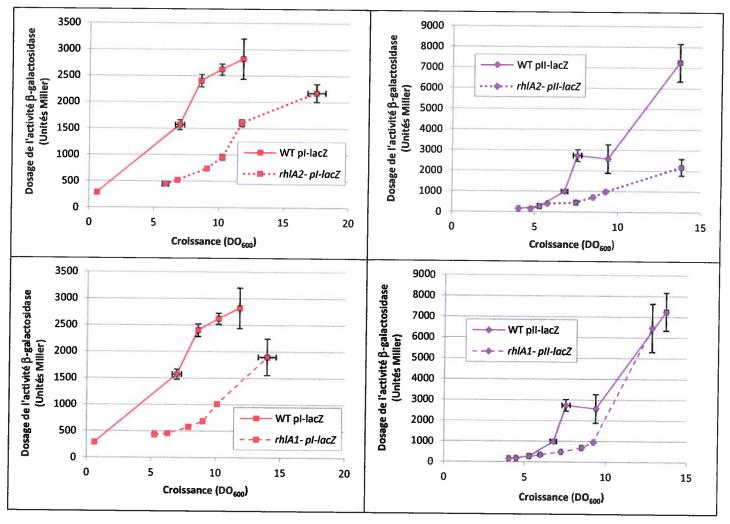


Figure 32 : Cinétiques de production de  $\beta$ -galactosidase par les mutants polaires simples rhlA2- (en haut) et rhlA1- (en bas) de B. thailandensis portant les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ, par rapport à la souche sauvage (WT).

Lorsque l'opéron 2 n'est pas fonctionnel, cela induit une baisse de la transcription des deux opérons. Lorsque c'est l'opéron 1 qui est inactivé, sa propre transcription est encore une fois amoindrie tandis que la transcription de l'opéron 2 est ralentie au départ, mais rattrape le niveau de la souche sauvage après un certain délai.

Ainsi, les deux opérons agiraient l'un sur l'autre, et sur eux-mêmes, comme des activateurs de transcription. Par ailleurs, l'opéron 2 semble être capable, avec un léger retard, de combler le manque d'activation que cause la mutation *rhlA1*- sur sa propre transcription, mais pas sur celle de l'opéron 1.

#### III.3.3.1. Impact de l'ajout de rhamnolipides sur la production totale

En considérant qu'une régulation croisée existe entre les opérons, il a été envisagé que ce soient directement les produits de ces opérons qui possèdent un effet activateur de l'expression des opérons, tel une boucle de rétro-action positive. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience a été réalisée en ajoutant, dès le début de la culture, différentes concentrations de rhamnolipides dans le milieu NB + 4% glycérol. Les échantillons ont été prélevés toutes les 24h pendant 7 jours, ainsi qu'avant ensemencement de la culture afin de déterminer la concentration exacte en rhamnolipides Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> ajoutés au départ. Ces rhamnolipides, initialement dilués au bain sonicateur dans l'eau, ont été ajoutés dans les proportions suivantes au milieu de culture : 0, 12, 40, 105, 167, et 410 ppm. Les profils cinétiques obtenus sont présentés dans la Figure 33. Les valeurs affichées correspondent au dosage effectué auquel a été soustraite la concentration initiale en Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>.

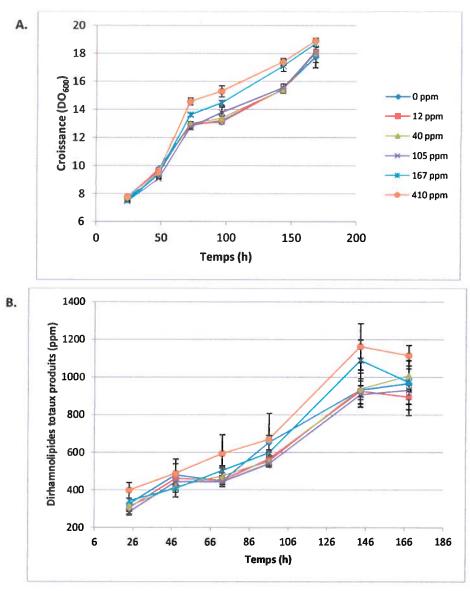


Figure 33 : Croissance (A) et cinétiques de production de Rha-Rha- $C_{14}$ - $C_{14}$  (B) par B. thailandensis E264 dans un milieu NB + 4% glycérol initialement supplémenté de rhamnolipides Rha-Rha- $C_{14}$ - $C_{14}$  (de 0 à 410 ppm) en fonction du temps.

Il apparaît que plus la concentration initiale en rhamnolipides dans le milieu est forte, plus la croissance est augmentée, spécialement au-delà d'une concentration initiale de 100 ppm. Pourtant, à la fin de la cinétique, il semble que tous les réplicats testés aient finalement atteint le même niveau de croissance. En termes de production de rhamnolipides, la différence n'est pas flagrante car toutes les cultures semblent posséder le même profil et la même vitesse de production. Cependant, dès le départ de la cinétique, les cultures possédant 167 et 410 ppm de rhamnolipides initiaux ont un profil de

production légèrement différent. Dans l'ensemble, ces deux cultures tendent à se distinguer des autres par une croissance et une production temporairement plus importante que les autres.

Il n'est pas réellement possible de conclure que les rhamnolipides ont un effet activateur de la production car les écart-types constatés se chevauchent et les productions et croissances à la fin de la culture se rejoignent pour toutes les conditions testées. Néanmoins, une différence est notable pour des concentrations initiales en rhamnolipides au-delà de 100 ppm.

## III.4. RECHERCHE DES RÉGULATEURS DIRECTS OU INDIRECTS DES OPÉRONS

## III.4.1. Pull-Down de molécules régulatrices par les régions intergéniques

Les molécules issues de cultures de *B. thailendensis* E264 et qui ont été théoriquement fixées sur les régions promotrices, selon les conditions testées (*cf.* section II.5.2), ont été séparées par gel d'électrophorèse. Le gel obtenu après coloration à l'argent est présenté en Figure 34. Malgré la très mauvaise qualité du résultat obtenu et bien que les protocoles soient encore à optimiser, certaines bandes du premier puits ont été découpées et analysées au spectromètre de masse.

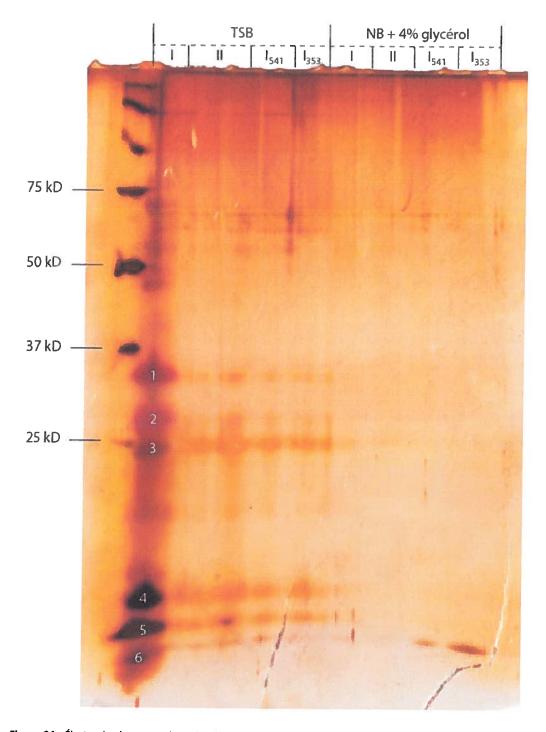


Figure 34: Électrophorèse sur gel acrylamide 12% des molécules récupérées après pull-down par les régions promotrices entières (I: prhIA1, II: prhIA2) ou écourtées (I<sub>541</sub>: prhIA1<sub>541</sub>, I<sub>353</sub>: prhIA1<sub>353</sub>). Les molécules proviennent de cultures de B. thailandensis en milieu TSB ou en milieu NB + 4% glycérol. 1 à 6: bandes extraites après coloration à l'argent et analysées au spectromètre de masse.

Quasiment toutes les bandes récoltées ont révélé une correspondance avec des protéines n'appartenant pas à *B. thailandensis* (β-lactoglobuline de taureau ou de mouton, caséine, etc.). Ceci est probablement dû à un problème de migration qui a fait converger les contenus des deux premiers puits (échelle de poids moléculaire et TSB-I). Néanmoins, les analyses ont démontré que la bande n°1 contient entre autres une protéine de *B. thailandensis* identifiée comme étant de la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR. Après un Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) de la séquence protéique récupérée du spectromètre de masse, il s'est avéré qu'il s'agit de la protéine codée par le gène BTH\_I1403, c'est-à-dire HmqR.

## III.4.1.1. Étude de systèmes hétérologues chez E. coli SM10 λpir

Les cinétiques de production de  $\beta$ -galactosidase par les systèmes hétérologues (cf. section II.5.3) ont pour but de vérifier une éventuelle interaction directe entre HmqR et les régions promotrices des opérons. Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

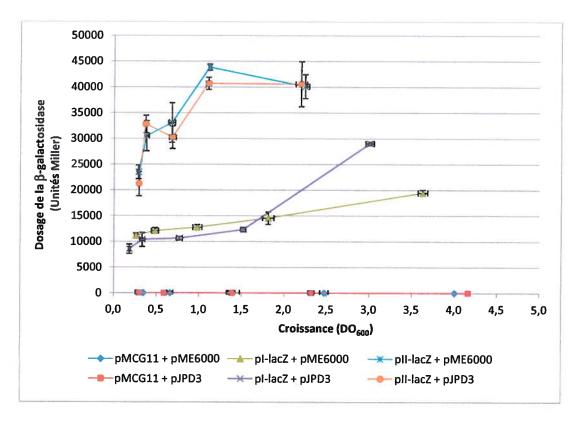


Figure 35: Cinétiques de production de β-galactosidase par les systèmes hétérologues chez E. coli SM10 λpir, en milieu TSB. Ces systèmes co-expriment les rapporteurs pl-lacZ, pll-lacZ ou le plasmide vide correspondant (pMCG11), avec HmqR (porté par le plasmide pPJD3) ou le plasmide vide correspondant (pME6000).

Sur la durée de l'expérience et avec la souche choisie, aucune différence notable n'est observée entre les souches qui co-expriment HmqR avec les rapporteurs, et celles qui n'expriment que les rapporteurs.

## III.4.2. Mutagénèse aléatoire par transposon

Une mutagenèse aléatoire par transposition a été effectuée sur les souches de *B. thailandensis* portant les rapporteurs plasmidiques pl-lacZ et pll-lacZ (cf. section II.5.1.1) servant à quantifier la transcription de chacun des deux opérons des rhamnolipides. Le but de cette expérience était d'identifier les régulateurs des systèmes rhl. Le transposon employé était un himarBP3 porté sur le plasmide pHBurk3 (cf. Figure 17). Afin d'obtenir des transposants, une conjugaison entre les souches de *B. thailandensis* et *E. coli* S17-1 (pHBurk3) a été effectuée, tel que décrit à la section II.3.5.2. Les transposants contiennent donc un des rapporteurs plasmidiques (pl-lacZ ou pll-lacZ) et un transposon inséré aléatoirement dans leur génome.

#### III.4.2.1. Criblage

Le criblage a été effectué à partir d'aliquots de transposants congelés à -80°C. Par manque de temps, seule une petite partie du criblage a été réalisée. Ainsi, au total, environ 10 plaques de géloses de 20 cm X 20 cm (section II.5.1.2) ont été utilisées, pour un total approximatif de 6000 colonies criblées.

Les transposants étaient sélectionnés selon la vitesse d'apparition de leur coloration bleue et l'intensité de celle-ci. Une colonie bleue foncée indiquait une activité plus importante de la β-galactosidase, reflétant ainsi une plus forte transcription d'un des opérons (dépendamment du rapporteur concerné). À l'inverse, une colonie bleue pâle ou blanche suggérait une expression plus faible de la β-galactosidase et donc, une transcription moindre de l'opéron concerné. La grosseur des colonies était aussi prise en considération, puisque les colonies plus petites pouvaient paraître plus foncées et vice-versa. La particularité des transposants rencontrés a été la diversité des teintes de bleu, parfois virant au vert, ainsi que l'évolution de la coloration et de la taille des colonies.

La Figure 36 présente un exemple, à petite échelle, des colonies observées sur les géloses. Les colonies totalement blanches étaient plus facilement identifiables au tout début du criblage (flèches vertes) tandis que les plus foncées étaient plus nettement repérables en fin de criblage (flèches rouges). Les colonies plus pâles (flèches orange), mais pas totalement blanches, devaient être repérées tôt dans

le criblage mais suivies jusqu'à la fin pour vérifier l'évolution de la coloration en comparaison avec la majorité des colonies (par exemple, évolution particulière de la colonie marquée d'un astérisque qui, pâle au début, est devenue plus foncée que la moyenne). Certaines colonies très petites mais néanmoins très bleues (flèche noire) étaient parfois sélectionnées car le défaut de croissance observé pouvaient être en lien avec une surexpression de rhamnolipides, tel qu'il a pu être observé lors de cinétiques en milieu liquide (cf. section IV.3).

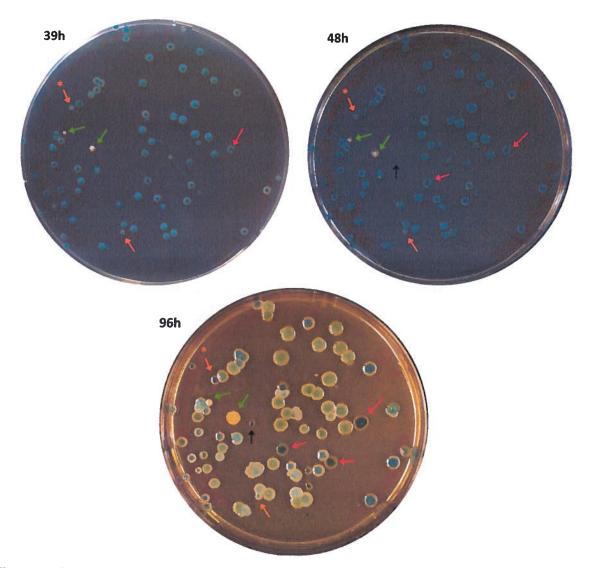


Figure 36 : Criblage dans le temps des transposants de B. thailandensis pll-lacZ sur gélose LB contenant de la trimétoprime, de la kanamycine, de la gentamycine et du Xgal. Les transposants sélectionnés sont repérés au fur et à mesure du criblage par des flèches : → colonies blanches, → colonies pâles, → colonies foncées, → colonie très petite et foncée. \* → : colonie pâle au début, foncée à la fin.

Dans la Figure 36, la dernière représentation (à 96h) est trop avancée dans le temps pour une sélection efficace (les colonies se chevauchent) mais elle a été malgré tout intégrée afin de démontrer la diversité des colorations rencontrées et la nécessité de sélectionner les colonies blanches ou pâles au début du criblage.

Étant donné l'expression assez peu reproductible des souches témoins sur milieu solide, les transposants sélectionnés n'ont pas été repiqués sur gélose pour être comparés, mais directement cultivés en milieu liquide TSB, supplémenté d'antibiotiques, pour être congelés à -80°C. Ainsi, un total de 118 transposants de *B. thailandensis* pl-*lacZ*, et 54 transposants de *B. thailandensis* pll-*lacZ* ont été conservés. Sur ces totaux, par manque de temps, seulement 38 transposants de chaque groupe ont été testés en milieu liquide, en un seul réplica, par comparaison avec les souches sauvages, lors de cinétiques de 4 jours avec dosage de la production de β-galactosidase. Des exemples de résultats obtenus sont présentés à la section III.4.2.3. Suite à l'analyse de ces résultats, 17 transposants de *B. thailandensis* pl-*lacZ* et 19 transposants de *B. thailandensis* pll-*lacZ* ont été retenus pour l'identification du site d'insertion du transposon.

#### III.4.2.2. Séquençage et analyse des produits PCR obtenus

Le séquençage a été effectué par le Service de séquençage de l'IRCM, comme décrit à la section II.5.1.3. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Sequence Scanner (Applied Biosystem). Puisque les séquences contiennent une portion homologue au génome de *B. thailandensis* E264 ainsi qu'une partie homologue au transposon, les séquences obtenues peuvent être comparées au génome de la bactérie afin d'identifier dans quel gène le transposon s'est inséré. Pour ce faire, les séquences ont été alignées en utilisant l'outil BLASTn du site burkholderia.com (Winsor *et al.*, 2008). Si aucune homologie n'était trouvée, la séquence était alors alignée avec le plasmide portant le rapporteur (par le logiciel BioEdit) ou subissait un BLASTn sur le site de NCBI pour vérifier si le transposon ne s'était pas inséré dans la construction et dans le gène *lacZ*.

Malgré un taux de succès de 83% obtenu lors du séquençage, celui-ci a été difficile à réaliser et plusieurs séquences ont dû être analysées deux ou trois fois. Précisément, 60% des séquences obtenues ont trouvé une correspondance dans le génome de *B. thailandensis*, les autres indiquant que le transposon s'était inséré dans le gène *lacZ* lui-même. Malheureusement, une des amorces utilisées lors des premières PCR doubles rondes n'était pas suffisamment spécifique au transposon (Tn-pHBurk1-R1 : 5'-GAAATCGGCAAAATCCCTTA-3') et a conduit, pour trois séquençages, à une

amplification aspécifique du chromosome II (autour de 2,9 kpb, soit la « fin » du chromosome). Ces « faux positifs » ne sont donc pas considérés comme séquencés et les PCR double ronde sont à refaire.

Grâce aux données du site burkholderia.com (Winsor et al., 2008), le contexte génomique d'insertion du transposon chez B. thailandensis a pu être étudié. Une visualisation graphique pour chaque transposon est disponible à l'appendice D (à l'exception des 3 faux positifs). La base de données a également permis l'identification des fonctions prédites des gènes affectés par le transposon, leur éventuelle présence au sein d'un opéron ainsi que la distance du transposon par rapport au codon d'initiation de la traduction.

## III.4.2.3. Caractéristiques des transposants affectés dans la transcription de rhIA1 ou rhIA2

Un total de 76 transposants a été quantifié en liquide pour l'expression de prhlA-lacZ au niveau transcriptionnel (38 pour chaque région promotrice). Leur profil d'expression a été comparé à la souche sauvage en calculant le rapport T suivant pour chaque point de prélèvement :

$$T = \left[ \frac{\text{Dosage } \beta - \text{galactosidase}}{DO_{600}} \right]_{tp} * \left[ \frac{DO_{600}}{\text{Dosage } \beta - \text{galactosidase}} \right]_{WT}$$

Avec : Le dosage de l'activité β-galactosidase en Unités Miller

tp = transposant

WT = souche sauvage (Wild Type)

Les transposants ont alors été répartis arbitrairement en quatre grandes catégories. La première catégorie rassemble les profils « Nuls » qui apparaissaient blancs sur gélose LB et qui n'ont pas réagi au dosage de l'activité de la β-galactosidase (T<0,07). La deuxième catégorie comprend les profils « Clairs ». Plus pâles sur gélose LB, ces souches ont révélé un profil de dosage de la β-galactosidase de plus de deux fois inférieur à la souche sauvage sur au moins trois des quatre mesures effectuées (0,07≤T≤0,5). Les profils « Foncés » sont quant à eux inclus dans la troisième catégorie. Au-delà des éventuels défauts de croissance, ces souches ont abouti à un dosage de l'activité de la β-galactosidase de plus de 1,5 fois supérieur à la souche sauvage sur au moins trois des quatre mesures effectuées (T≥1,5). Enfin, toutes les souches restantes ont été classées parmi les profils « WT » (Wild Type) car elles ne présentaient pas de différences jugées significatives par rapport à la souche sauvage. La répartition des transposants pour l'opéron I (pI-lacZ) et pour l'opéron II (pII-lacZ) est représentée sur la Figure 37. Le nombre total de transposants de pII-lacZ n'est que de 37 car l'un d'eux n'a pas poussé en préculture.

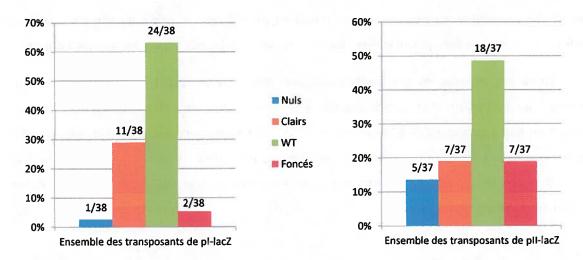


Figure 37: Distribution des transposants dans les différentes catégories suite à l'analyse des profils de dosage de la β-galactosidase.

#### III.4.2.3.1. Les profils « Nuls » de pl-lacZ et de pll-lacZ

Tous les transposants de ce groupe ont une activité pl-lacZ ou pll-lacZ nulle lors du dosage en culture liquide et leurs colonies sont blanches sur gélose LB supplémentée de X-gal (T<0,07). Au vu de l'excellente corrélation entre les profils sur gélose et les dosages en culture liquide, certains transposants ont été séquencés sans même avoir été dosés en culture liquide. Il s'agit, pour le rapporteur pl-lacZ, des transposants I-95 à I-100, et pour le rapporteur pll-lacZ, des transposants II-43 et II-44. La majorité des séquençages effectués pour cette catégorie de transposants a révélé que le gène lacZ était directement affecté. Puisque la β-galactosidase est inactivée dans ces mutants, l'ONPG ne peut pas être clivé. Ces transposants ne sont pas reliés à la transcription des opérons rhl, mais démontrent la redondance de la méthode de criblage.

Cependant, trois souches de cette catégorie ont malgré tout fourni une correspondance avec le génome de *B. thailandensis* lors du séquençage. Les caractéristiques de ces mutants sont présentées dans le Tableau 16. Le profil du dosage de la β-galactosidase pour le mutant II-16 est visible sur la Figure 38. Pour chacun de ces trois mutants, le transposon est tombé dans une région intergénique, parfois au niveau du site même de l'initiation de la traduction d'un gène (mutant I-96). Il est possible que les gènes soient affectés dans leur expression par la présence du transposon au sein de leur région promotrice. Étant donné le contexte génomique du mutant I-96, il est même possible que le transposon affecte la transcription des deux gènes qui l'encadrent car la région intergénique est très petite (*cf.* Appendice D).

Mais pour le mutant II-16, les deux gènes encadrant le transposon sont orientés dans sa direction et *HimarBP3* n'interfère donc dans aucune région promotrice prédite.

Tableau 16 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Nuls ».

#Gène B. thailandensis E264 affecté	#Mutant	Gène affecté	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon
	I-95	intergénique	Devant BTH_II2012, Protéine de fixation à l'ADN	non	2459983	•
	I-96	intergénique	Devant BTH_I3222 acetyltransférase	BTH_I3222- BTH_I3221 (régulateur transcriptionnel)	3669684	+
	II-16	intergénique	Entre deux gènes convergents, BTH_II2002 et BTH_II2003	non	2447946	
Mutations dans le	rapporteur					
	I-11	lacZ	β-galactosidase			
	1-97	lacZ	$\beta$ -galactosidase			
	1-98	lacZ	β-galactosidase			
	1-99	lacZ	β-galactosidase			
	I-100	lacZ	β-galactosidase			
	II-21	lacZ	β-galactosidase			
	11-23	lacZ	β-galactosidase			
	11-24	lacZ	β-galactosidase			
	II-25	lacZ	β-galactosidase			
	II-43	lacZ	β-galactosidase			
	11-44	lacZ	β-galactosidase			

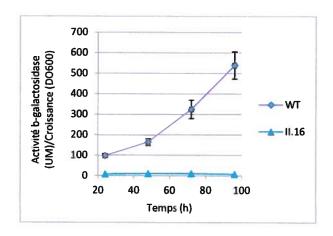


Figure 38 : Exemple de l'activité du rapporteur transcriptionnel pli-lacZ chez un transposant appartenant à la catégorie « Nuls ».

### III.4.2.3.2. Les profils « Clairs » de pl-lacZ et pll-lacZ

Pour appartenir à cette catégorie, les transposants devaient avoir un rapport T compris entre 0,07 et 0,5 sur au moins trois des quatre mesures effectuées. Tous rapporteurs confondus, 18 mutants ont été sélectionnés dans cette catégorie et les caractéristiques de ceux qui ont été séquencés sont disponibles dans le Tableau 17. Plusieurs mutations sont intervenues dans des régions codant pour des protéines hypothétiques, certaines présentant des homologies avec des systèmes de transport ou de sécrétion. Le transposon s'est également intercalé dans des régions promotrices ou dans des gènes ayant une importance plus large au sein de la cellule et ne sont donc probablement pas spécifiquement lié au système de production des rhamnolipides. Tel est le cas des mutants I-14, I-29, II-3, et même I-12 puisque, chez ce dernier, le transposon peut altérer le fonctionnement de l'opéron entier qui intervient dans le repliement des protéines, le transport et le métabolisme d'acides aminés et de lipides. Des exemples de profils de dosage de la β-galactosidase pour ces transposants sont présents à la Figure 39.

Tableau 17 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Clairs ».

#Gène <i>B. thailandensis</i> E264 affecté	#Mutant	Gène affecté	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance au codon d'initiation	Brin codant
BTH_I1166	I-12	BTH_I1166	Protéine hypothétique	BTH_I1167- BTH_I1163	1312146		335	
BTH_10916,				_	1042144	-	66	
BTH_12078,					2352800	+	66	+
BTH_I3118,					3556252	+	66	+
BTH_I3162,					3606281	+	66	+
BTH_II0465,	I-14	ISBma1	transposase	non	555336	+	126	+
BTH_I0734,					843504	+	66	+
BTH_II1656,					1736913	+	75	+
BTH_12586,					2948189	-	75	-
ou BTH_I1535					1943628	-	66	
	I-29	intergénique	Devant BTH_I1005, protéine accessoire de la phospholipase C	BTH_I1005- BTH_I1006	1141569	+		
	II-3	intergénique	Devant BTH_II1416, oxydoréductase	BTH_II1416- BTH_II1412	1669177	-		
BTH_12708	II-9	BTH_I2708	Protéine hypothétique, homologie avec système de sécretion type VI	non	3103296		1204	
BTH_I1418	II-20	BTH_I1418	Protéine hypothétique, homologie avec transport et fixation de protéines	BTH_I1418- BTH_I1416 (régulateur type LysR)	1599626	+	730	-
	11-38	lacZ	β-galactosidase					
Mutants non séqu	uencés							

I-2, I-5, I-18, I-20, I-28, I-34, I-36, I-38

<sup>11-2, 11-4, 11-22</sup> 

Les mutants I-29 et II-3 ont intégré le transposon au niveau de régions intergéniques et peuvent donc altérer la transcription des deux autres gènes qui encadrent ces régions intergéniques (codant pour une protéine hypothétique et une sérine métalloprotéase MprA, respectivement). Cependant, le transposon est bien plus proche de l'origine de traduction des gènes cités dans le Tableau 17.

Malgré l'insertion du transposon dans lacZ chez le mutant II-38, celui-ci présente une légère activité de la  $\beta$ -galactosidase. Ceci peut s'expliquer par le fait que le transposon s'est inséré très proche du site d'initiation de la traduction du gène. L'activité dosée peut donc être dû à une fuite d'expression de lacZ qui, malgré la mutation, peut générer une enzyme active.

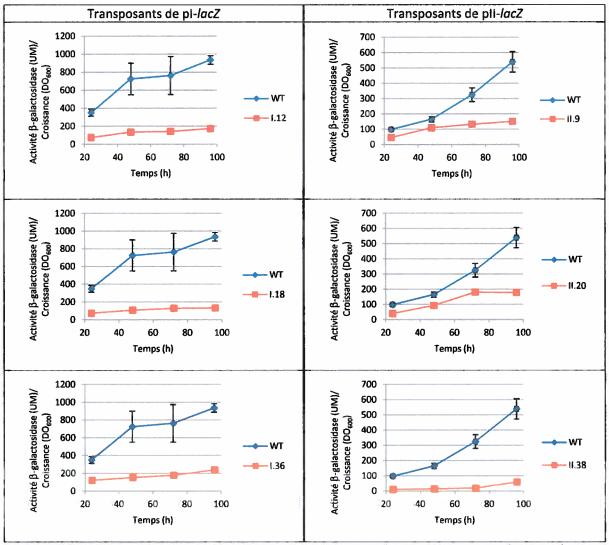


Figure 39: Exemples d'activité des rapporteurs transcriptionnels pl-lacZ et pll-lacZ chez les transposants qui font partie de la catégorie « Clairs ». WT = souche sauvage de B. thailandensis E264.

#### III.4.2.3.3. Les profils « Foncés » de pl-lacZ et pll-lacZ

Le groupe des « Foncés » comprend les transposants qui présentaient un rapport T supérieur ou égal à 1,5 sur au moins trois des quatre prélèvements effectués. C'est le cas de 9 transposants au total, mais plus particulièrement flagrant pour les mutants I-16, II-28, II-34 et II-36 dont les profils, visibles dans la Figure 40, étaient nettement supérieurs à la souche sauvage. Il n'est pas possible, pour le mutant I-16, de déterminer exactement où le transposon s'est intercalé dans le génome car l'analyse du séquençage a fourni plusieurs correspondances (cf. Tableau 18). Cependant, elles sont toutes en lien avec un gène rrf codant pour un ARN ribosomal 5S. Les mutants II-28 et II-36 concernent quant à eux des protéines hypothétiques dont rien n'est connu. Le gène BTH\_I1925, interrompu dans le mutant II-36, est même inclus dans un opéron contenant uniquement des protéines hypothétiques aux fonctions inconnues.

Tableau 18 : Caractéristiques des transposants de la catégorie « Foncés ».

#Gène B. thailandensis E264 affecté	#Mutant	Gène affecté	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance au codon d'initiation	Brin codant
BTH_I1100,		rrfB			1242723			+
BTH_12894,	I-16	rrfC rrfD	ARN ribosomal 5S	non	3328143	+	22	• •
BTH_I3091,					3525078	+	33	- 100
ou BTH_II2043		rrfA			2490647	+		
	I-22	intergénique	Devant BTH_I3154, protéine de la famille des efflux de cations	non	3597560	-		
BTH_II1267	11-28	BTH_II1267	Protéine hypothétique	non	1511057	+	270	+
BTH_II2008	II-34	BTH_II2008	ADN primase	non	2457840	-	2565	+
BTH_I1925	II-36	BTH_I1925	Protéine hypothétique	BTH_I1928- BTH_I1924	2170419		147	
BTH_I2989	II-37	hisH	Imidazole glycérol phosphate synthase, sous-unité HisH	hisC-2, hisB, BTH_12990, hisH	3430016	-	35	-
Mutants non séqu	iencés							
11-29, 11-14, 11-30								

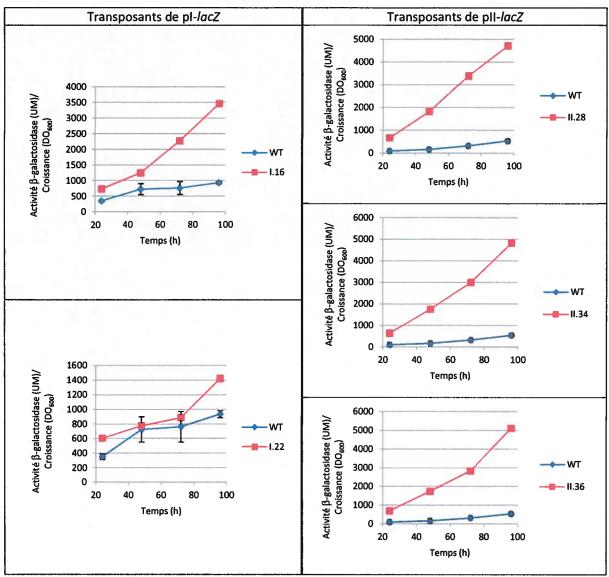


Figure 40 : Exemples d'activité des rapporteurs transcriptionnels pl-lacZ et pll-lacZ chez les transposants qui font partie de la catégorie « Foncés ». WT = souche sauvage de B. thailandensis E264.

## III.4.2.3.4. Les « WT » de pl-lacZ et pll-lacZ

Finalement, la dernière catégorie regroupe tous les transposants qui ne correspondaient pas aux critères de sélection des autres groupes. Ils sont donc jugés non significativement différents de la souche sauvage. Aucun des transposants de ce groupe n'a été séquencé.



Chapitre IV: DISCUSSION

## IV.1. ANALYSES SUR LES SÉQUENCES GÉNOMIQUES DES OPÉRONS

#### IV.1.1. Phylogénies

Les études phylogénétiques réalisées dans ce projet avaient pour but de souligner le lien entre certaines espèces bactériennes sur la base des homologies de chacun des gènes *rhl*. Les différents arbres ont été élaborés à partir d'un nombre relativement restreint de séquences génétiques, parfois longues et relativement peu conservées. De ce fait, les distances évolutives ne sont pas comparables à celles rencontrées pour des arbres phylogénétiques basés sur des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S, par exemple. Cependant, à l'échelle de ce projet, les analyses restent pertinentes puisqu'elles permettent uniquement d'illustrer qualitativement les homologies observées lors des alignements multiples des séquences génétiques. Aucune validation statistique n'a été réalisée puisqu'il s'agissait ici d'une analyse exploratoire.

Lors des recherches effectuées par BLASTn des gènes *rhl* de *B. thailandensis*, il est apparu qu'un assez grand nombre de souches, issues de différentes espèces bactériennes, possèdent des gènes homologues à *rhlA*, *rhlB* ou *rhlC*. Mais la grande majorité ne détient qu'un ou deux de ces gènes de façon isolée dans le génome, et la plupart n'a pas encore démontré de capacité à produire des rhamnolipides en laboratoire. Les résultats d'homologie ont révélé qu'en réalité, *P. aeruginosa* et quelques espèces du genre *Burkholderia* sont pour l'instant les seules à posséder des homologues pour chacun des trois gènes *rhl* et les protéines associées.

La comparaison de séquences génomiques plus larges soulignent que les souches du genre Burkholderia présentent la particularité de posséder une « région rhl » d'environ 8 kpb plutôt bien conservée d'une espèce à l'autre, vraisemblablement formant un opéron polycistronique. Certaines ne possèdent qu'une copie de cette région, alors que d'autres (B. mallei, B. pseudomallei, B. gladioli et B. thailandensis) possèdent deux paralogues au sein de leur génome. Bien qu'unique pour chaque souche et chaque « région rhl », les promoteurs sont également très bien conservés chez ces bactéries puisqu'ils permettent d'améliorer considérablement les pourcentages d'homologie entre les segments comprenant les gènes rhl (cf. Figure 19 et Figure 20).

Tout cela suggère que la « région *rhl* », promoteur inclus, devaient exister chez un ancêtre commun du genre *Burkholderia*. Il se pourrait qu'ensuite, une souche ait évoluée en ne conservant qu'une copie de cette région dans son génome tandis qu'une autre aurait subi la duplication d'une partie

de son matériel génétique aboutissant à deux paralogues de cette région. Au vu des résultats obtenus en section III.1.3.1, la région promotrice prhlA2 parait être plus répandue que prhlA1 mais il n'est pas réellement possible d'en conclure qu'elle serait génétiquement plus proche de la région promotrice ancestrale que prhlA1.

Beaucoup d'hypothèses pourraient être élaborées quant à l'évolution possible des gènes *rhl* au sein d'ancêtres bactériens jusqu'aux souches possédant aujourd'hui des homologues. Les possibilités sont trop nombreuses et ont été trop peu investiguées pour être discutées dans ce mémoire. Le but étant d'évaluer les homologies entre *B. thailandensis* et ses voisines au niveau des gènes *rhl*, il est important de retenir tout d'abord que la conservation d'une « région *rhl* » au sein des souches de *Burkholderia* concernées souligne l'importance de tous les gènes en cause. En effet, en plus des trois gènes *rhl*, ces régions comprennent également trois autres gènes conservés semblant appartenir à des systèmes de résistance ou à des mécanismes d'efflux de composés. Il serait intéressant d'étudier l'effet de mutations (non-polaires) au sein de ces gènes afin d'évaluer leur impact sur la production de rhamnolipides ou sur la survie de la bactérie.

Les études d'homologie ont également permis de faire ressortir *B. thailandensis* comme étant une souche légèrement à part, dans toutes les comparaisons effectuées. Le rapprochement phylogénique avec ses plus proches cousines peut néanmoins être utilisé en bioinformatique pour la comparaison génomique, notamment des régions promotrices, et éventuellement la recherche de nouveaux motifs ou boîtes servant à la régulation spécifique de la production de rhamnolipides. Aujourd'hui, les bases de données ne semblent pas encore assez complètes pour travailler sur la mise en évidence de ces éventuels motifs. Mais les génomes complets de nouvelles espèces sont séquencés tous les jours et il pourrait être intéressant de réévaluer cette option d'ici quelques années.

#### IV.1.2. Régions promotrices

Plusieurs travaux ont été effectués en parallèle afin d'expliquer la différence de régulation observée entre les deux opérons de *B. thailandensis* (*cf.* section 1.3.3.1). Plusieurs se sont donc concentrés sur l'étude des régions promotrices. Que ce soient les résultats d'homologie ou les prédictions de promoteurs, il est rapidement apparu que ces régions promotrices étaient relativement uniques et complexes. Ainsi, certains résultats ont orienté les conclusions vers la prédiction de régions promotrices plutôt courtes quand d'autres suggéraient au contraire l'importance de la totalité des régions intergéniques. Un résumé de ces résultats est illustré dans la Figure 41.

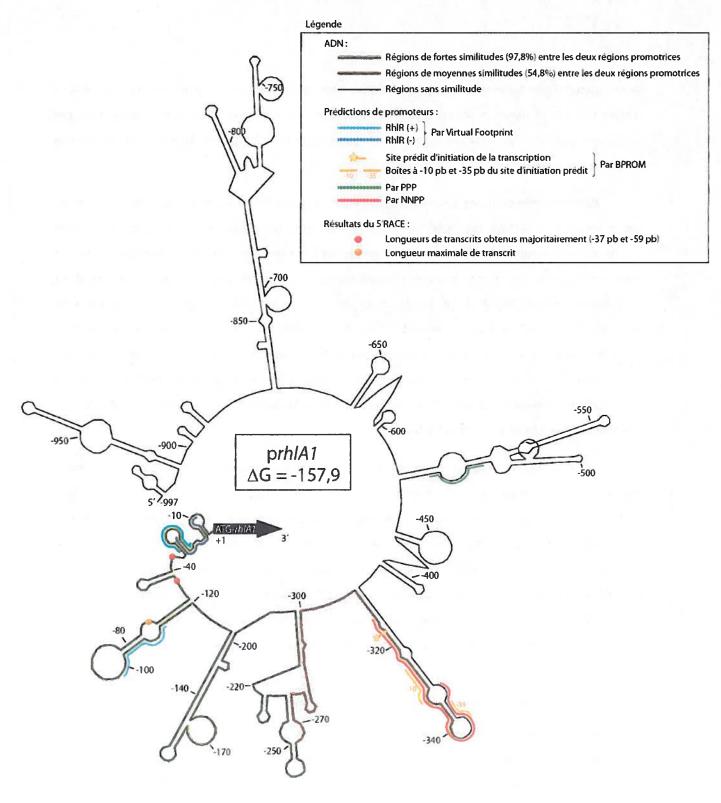


Figure 41: Schématisation des résultats combinés des analyses bioinformatiques (repliement, prédiction de promoteurs) ainsi que des résultats du 5'RACE pour les séquences intergéniques prhlA1 et prhlA2 de B. thailandensis. Pour la prédiction de promoteur: pour chaque logiciel utilisé, seules les prédictions les plus proches du site d'initiation de la traduction sont représentées.

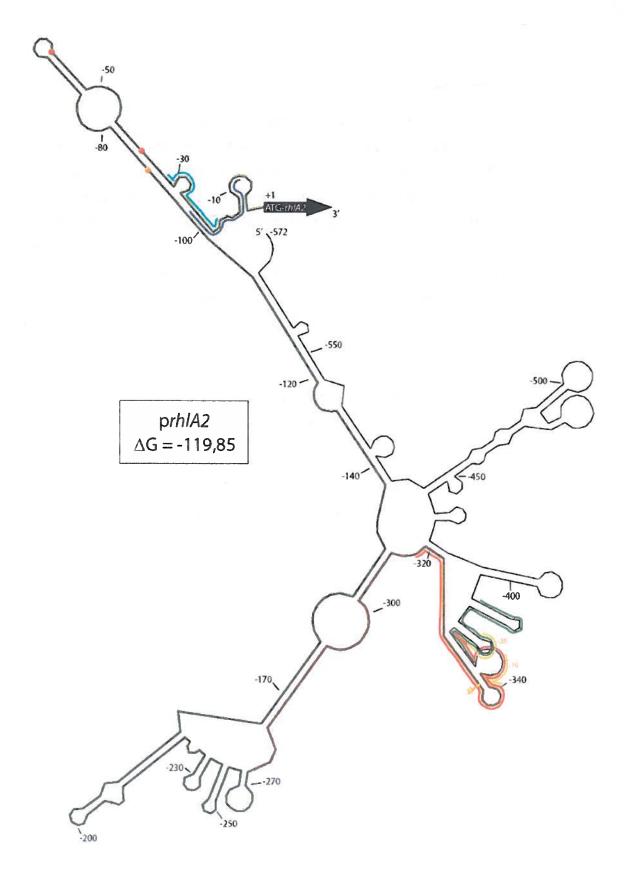


Figure 41 (Suite)

#### IV.1.2.1. Régions courtes?

Les premiers résultats appuyant l'hypothèse de régions promotrices plutôt courtes sont ceux du 5'RACE (cf. Figure 28, p. 100). En effet, l'analyse des clones sélectionnés montre que l'origine de la transcription serait située au maximum à -90 pb du site d'initiation de la traduction. La multitude des longueurs de transcrits obtenus suggère qu'au moins un des opérons est régulé par plus d'un régulateur transcriptionnel. Deux sites majoritaires à -59 pb et -37 pb laissent croire qu'il pourrait s'agir des deux sites privilégiés d'initiation de la transcription chez chacune des régions promotrices, sans pouvoir distinguer l'une de l'autre. Dans tous les cas, la technique utilisée semble indiquer que la transcription s'initie dans la portion de 270 pb similaire à 97,8 % chez les deux régions intergéniques. Cette portion possèdant également le taux en G:C le plus élevé, il a alors été envisagé que la rétrotranscription, lors de la première étape du 5'RACE, n'aie pas pu être complétée à cause de repliements solides des ARNm de rhlA. L'expérience a donc été répétée avec un protocole légèrement différent, fourni avec le kit, et spécialement conçu pour les régions riches en G:C. Les résultats n'ont pas été présentés dans ce document car le gel d'agarose (TBE 1,5 %) a révélé exactement les mêmes profils que pour la technique classique du 5'RACE (cf. Figure 27 p. 99).

L'observation des résultats du 5'RACE est en contradiction avec le fait d'avoir une régulation différente pour chacun des opérons car, bien souvent, le régulateur se fixe de façon assez proche du site d'initiation de la transcription. Comme cette portion des régions promotrices est très conservée, il parait peu probable que l'une soit régulée différemment de l'autre. Pourtant, la prédiction de promoteurs par Virtual Footprint a permis de constater que le motif associé à RhIR de *P. aeruginosa*, au sein de cette portion, pouvaient se retrouver chez prhIA1 mais pas chez prhIA2. En effet, à cause de la présence d'une cytosine au lieu d'une thymidine à -105 pb du site d'initiation de la traduction, prhIA2 ne présente pas de motif compatible avec une régulation par RhIR. Sans pouvoir déterminer si cette seule différence permet réellement une régulation différentielle, elle semble toutefois indiquer que, malgré la forte ressemblance des séquences, il est envisageable qu'elles soient malgré tout reconnues différemment par des régulateurs.

Les derniers résultats appuyant l'hypothèse de régions promotrices assez courtes sont ceux obtenus par BLASTn des régions intergéniques. En effet, autant ces régions sont plutôt conservées dans leur globalité d'une espèce à l'autre, autant les quatre souches de *B. mallei* considérées n'ont besoin, pour l'une de leur « région *rhl* », que des premières 114 pb de p*rhlA2* (*cf.* Tableau 13 p. 88 et Appendice C). Aucune étude n'ayant été réalisée sur la régulation différentielle de leurs gènes *rhlA*, il n'est pas

prouvé que leur expression subisse le même type de régulation que les opérons de *B. thailandensis*. Néanmoins, il est fort probable que cette centaine de paires de bases contienne l'information nécessaire à la transcription du gène. Par homologie, il est possible que prhlA2, chez *B. thailandensis*, contienne une région promotrice assez courte ne dépassant pas la région des 270 pb de forte similitude.

#### IV.1.2.2. Régions plus larges?

En considérant les résultats préliminaires qui sous-entendaient que les opérons 1 et 2 n'étaient pas régulés de la même façon (cf. section 1.3.3.1), il avait été suggéré que, si une différence dans la régulation transcriptionnelle existait, elle devait se situer en amont de la zone de similitude de 270 pb, région où les différences entre les séquences génétiques sont assez importantes pour présenter des promoteurs distincts. Alors que Virtual Footprint a été le seul logiciel capable de prédire des promoteurs au sein même de la région de fortes similitudes, les trois autres logiciels utilisés ont obtenus des résultats appuyant la première hypothèse : les promoteurs étaient prédits en amont de cette zone, soit dans la partie où les séquences génétiques diffèrent notablement. Ces prédictions se retrouvent donc assez loin des sites d'initiation de la transcription découverts par le 5'RACE. Cependant, plusieurs études récentes portant sur le repliement et le dynamisme de l'ADN bactérien suggèrent que certaines zones éloignées peuvent aisément être rapprochées dans l'espace, ou encore que de nombreuses enzymes (topoisomérases entre autres) travaillent à décaténer l'ADN selon les besoins de la cellule (réplication, réparation, etc.) (Boccard et al., 2005; Espeli et al., 2008; Thanbichler et Shapiro, 2006).

Les analyses de repliements effectuées dans ce projet ont initialement été réalisées suite à la mise en évidence du fort taux de G:C des séquences intergéniques. Les différences observées semblent être dues davantage aux séquences entières plutôt qu'à des portions délimitées de ces séquences. Bien que ces analyses soient très peu poussées et qu'elles ne tiennent pas compte de facteurs importants (comme le fait que l'ADN double brin est peu probablement dédoublé sur toute la longueur des séquences intergéniques), elles permettent de visualiser le fait que les régions promotrices sont nettement différenciables malgré les portions similaires. L'hypothèse qu'un repliement particulier existe pour chacune des séquences intergéniques est tout à fait envisageable et des études plus poussées seraient sûrement intéressantes, notamment concernant la mise en évidence d'un motif (boucle ou autre) permettant ou bloquant l'accès de facteurs de transcription. Cette étude se révèlerait d'autant plus pertinente si les régulateurs directs des opérons étaient identifiés.

Les résultats obtenus sur les analyses comparatives des « régions rhl », promoteurs inclus, démontrent également l'importance de la région intergénique dans sa totalité. En effet, dans la majorité des cas, cette région et les gènes environnants (amont et aval) sont très bien conservés. Une dernière expérience, dont les résultats sont présentés en section III.3.2.1, a conforté cette hypothèse. Dans ce test, les rapporteurs écourtés pour la région promotrice 1 (pl<sub>541</sub>-lacZ et pl<sub>353</sub>-lacZ) ont révélé des profils de transcription nettement diminués par rapport au rapporteur entier (pl-lacZ, cf. Figure 29 p. 101). Il est à noter qu'ici, les rapporteurs tronqués sont ceux correspondant à la région intergénique 1 uniquement. Malgré la similitude des séquences entre les deux régions promotrices, rien n'indique que des rapporteurs tronqués pour prhlA2 donneraient les mêmes résultats, surtout si les conclusions discutées dans le dernier paragraphe de la section précédente sont pris en compte. Il serait donc intéressant de construire et de tester de nouveaux rapporteurs écourtés pour la deuxième région intergénique.

#### IV.2. LA TRANSCRIPTION DES OPÉRONS

#### IV.2.1. De l'ADN aux ARNm

Les travaux préliminaires de Dubeau et al. (2009) ayant été effectués sur des mutants simples, il n'était pas réellement possible d'évaluer l'implication, chez la souche sauvage, de chaque opéron dans la production totale de rhamnolipides car les mutations ont pu induire des modifications métaboliques insoupçonnées. L'étude de la transcription par les rapporteurs a permis de confirmer l'hypothèse émise en section I.5.1, à savoir que les opérons ne sont pas exprimés de manière égale dans la souche sauvage. Comme évoqué dans la section III.3.2.1, l'opéron 1 semble activé de façon relativement continue dès le début de la culture tandis que le deuxième opéron subit une réelle activation au-delà d'un seuil de croissance. Ce profil particulier traduit nettement une sensibilité au QS. Il n'est pas vraiment possible d'affirmer que l'opéron 1 y est insensible car certains profils cinétiques ont illustré le contraire. En effet, les problèmes de reproductibilité rencontrés pour le rapporteur pl-lacZ ont conduit à l'observation de profils plus ou moins sigmoïdaux, non seulement au fil des expériences mais également entre réplicats d'une même cinétique. Cependant, la tendance générale a toujours été maintenue : l'opéron 2, moins transcrit au début, finit toujours par avoir une expression plus forte que l'opéron 1 en fin de cinétique.

La production de rhamnolipides totale serait donc d'abord due à la transcription de l'opéron 1 puis, après l'activation du QS, davantage à l'opéron 2. Cependant, le niveau de transcription de l'opéron

1, même en fin de cinétique, sous-entend qu'il contribue malgré tout à une part assez importante de la production totale. Tous ces résultats corroborent ceux de Dubeau et al. (2009) qui démontraient une production de rhamnolipides plus importante de l'opéron 2 (dans un mutant  $\Delta rhlA1$ ) par rapport à l'opéron 1 (dans un mutant  $\Delta rhlA2$ ) (cf. Figure 8 p.35).

#### IV.2.1.1. Les ARNm

Les résultats du 5'RACE semblent indiquer que les ARNm produits pour *rhlA1* ou *rhlA2* sont quasiment identiques. Comme plusieurs longueurs de transcrits sont détectées, il doit exister plus d'un régulateur transcriptionnel. Cependant, les très faibles différences de longueur des ARNm suggèrent que, si les opérons sont régulés différemment, cela s'effectue avant la transcription car, les transcrits étant fortement similaires, les régulations post-transcriptionnelles éventuelles sont probablement les mêmes pour les deux opérons.

Il est important de souligner que les ARNm totaux utilisés pour l'expérience du 5'RACE ont été extrait d'un mutant surproducteur de rhamnolipides : le mutant hmqR-. Au vu des résultats présentés en section III.3.2.2, il semblerait qu'un tel mutant possède une bien plus grande proportion en ARNm de rhlA2 que de rhlA1. Cette particularité peut très bien avoir biaisé les résultats du 5'RACE bien que les quatre plus long transcrits retrouvés prouvent la présence des deux types d'ARNm (cf. Figure 28 p. 100). Pour plus d'exactitude, l'expérience serait donc à réitérer sur des ARN totaux extraits de la souche sauvage.

Par ailleurs, malgré les résultats similaires obtenus par la technique améliorée du 5'RACE (pour le haut taux de G:C, cf. section III.3.1), il n'est pas impossible qu'un repliement solide de la région intergénique aie bloqué la rétrotranscription des ARNm, aboutissant ainsi à des ADNc tronqués et biaisant donc les résultats obtenus. Il est également envisageable que les ARNm aient été partiellement dégradés durant l'expérience, ou qu'eux-mêmes aient subi un repliement particulièrement solide, conduisant, encore une fois, à l'obtention d'ADNc tronqués. L'élaboration d'une méthode semblable au 5'RLM-RACE (« RNA Ligase Mediated – RACE »), existant pour les ARNm eucaryotes, a été envisagée pour contourner ces difficultés mais elle nécessite plusieurs mises au point (cf. Figure 42). Dans cette technique, les ARNm totaux seraient traités successivement par deux enzymes : la première (la Terminator 5'-phosphate dependent exonuclease) permettrait de déphopshoryler en 5' uniquement les ARNm tronqués, tandis que la deuxième enzyme (la « TAP » ou Tobacco Acid Pyrophosphatase) serait utilisée pour enlever un pyrophosphate en 5' des ARNm non tronqués seulement. Ensuite, un adaptateur

serait ajouté en 5' monophosphaté des ARNm non tronqués. Celui-ci servirait, après rétrotranscription, comme support pour une amorce de PCR. Ainsi, seuls les ARNm non tronqués et rétrotranscrits jusqu'à leur extrémité 5' (portant l'adaptateur) seraient amplifiés par PCR. Bien que très sélective, cette méthode n'en est pas moins délicate car elle nécessite la manipulation et le traitement à différentes températures de l'ARNm pendant plusieurs heures.

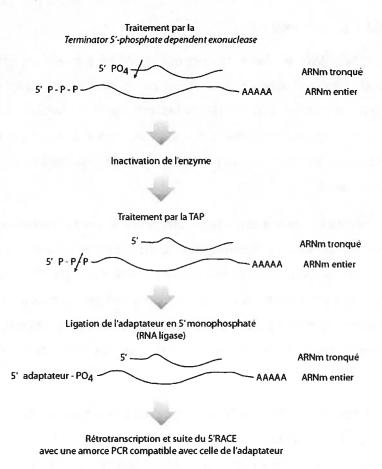


Figure 42 : Principe du 5'RLM-RACE adapté aux procaryotes.

## IV.2.2. La régulation par le Quorum Sensing

## IV.2.2.1. Le rôle de chaque système

Pris individuellement, chaque système a été testé pour son impact sur la production totale de rhamnolipides. Il est ainsi apparu que les systèmes btaRl1, btaRl2 et btaR5 ont un effet activateur de la production tandis que btaRl3 a au contraire un fort effet inhibiteur. Bien que, d'un point de vu transcriptionnel, l'opéron hmq semble agir comme activateur de l'opéron 1 et léger répresseur de l'opéron 2, la production globale de rhamnolipides reste très semblable à celle de la souche sauvage. Le régulateur BtaR4, quant à lui, ne semble avoir aucun impact. Enfin, HmqR s'est révélé être un inhibiteur encore plus puissant que le système btaRl3.

L'évaluation de l'impact du QS par la seule production de rhamnolipides ne permet cependant pas de préciser sur lequel des opérons agit chaque système. Grâce au suivi de la transcription par les rapporteurs dans certains mutants du QS, il a été possible de compléter partiellement ces résultats. La Figure 31 (p. 105) a ainsi démontré qu'HmqR et Btal3 agissent pratiquement exclusivement sur l'opéron 2. BtaR5 semble agir aussi bien sur l'opéron 1 que sur l'opéron 2. Paradoxalement, le mutant hmqA-, qui ne présente pas de différence en termes de production de rhamnolipides par rapport à la souche sauvage (cf. Figure 25 p. 96), révèle une baisse de la transcription pour l'opéron 1 et une augmentation, en fin de cinétique, pour l'opéron 2. Ceci est étonnant au vu des résultats précédents, obtenus pour le mutant hmqR-, et résumés dans la figure ci-dessous.

En effet, des résultats non publiés avaient démontré qu'un mutant *hmqR*- ne produit pas de HMAQ (*cf.* section I.4.2.3.2), et donc, en toute logique, aucun autre produit de l'opéron *hmq*. Il devrait dès lors présenter un profil de transcription de l'opéron 1 similaire à celui du mutant *hmqA*-, ce qui n'est pas le cas. Par ailleurs, un mutant *hmqA*-, du fait de la forte baisse de transcription de l'opéron 1, et malgré l'augmentation de la transcription de l'opéron 2 en fin de cinétique, devrait générer moins de rhamnolipides que la souche sauvage, ce qui n'a pas non plus été observé. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ces phénomènes.

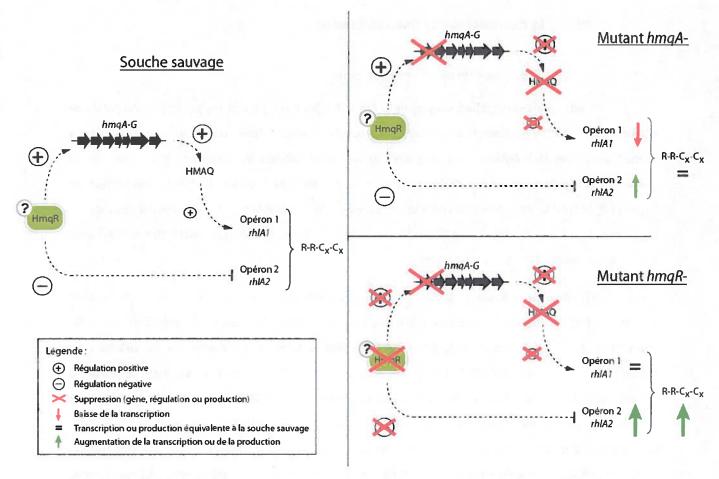


Figure 43 : Résumé des résultats obtenus pour les mutants hmqA- et hmqR- de B. thailandensis, en termes de transcription des opérons rhl et de production totale de rhamnolipides.

Tout d'abord, il est possible que, bien que transcrit, l'opéron 1 ne contribue que très faiblement à la production totale de rhamnolipides. Ceci corroborerait les résultats obtenus par Dubeau et al. (2009) pour qui ce même opéron conduisait à une production de rhamnolipides, chez un mutant simple  $(\Delta rhlA2)$ , de près de 4 fois inférieure à celle de l'opéron 2 (dans un mutant simple  $\Delta rhlA1$ ) et de 10 fois inférieure à celle de la souche sauvage (cf. Figure 8 p.35). Dans ce cas, la production totale de rhamnolipides pour le mutant hmqA- serait facilement compensée par l'augmentation de transcription de l'opéron 2 qui a été observée. Ainsi, la production globale de rhamnolipides varierait trop peu sur la durée de la cinétique pour être distinguée de celle de la souche sauvage. Pour visualiser plus clairement les effets de la mutation hmqA- sur les opérons, il serait intéressant de la transférer chez les mutants simples rhlA- puis de suivre leur production de rhamnolipides.

Chez le mutant hmqR-, aucune variation dans la transcription de l'opéron 1 n'a été mesurée mais une très forte augmentation de celle de l'opéron 2 a nettement été détectée. Il est bien sûr possible que, étant donné les problèmes de reproductibilité des dosages du rapporteur pl-lacZ, cette variation de la transcription de l'opéron 1 ait été indétectable. Dans ce cas, la cinétique serait à refaire pour confirmer les résultats. Mais une autre hypothèse peut également expliquer cette observation. Elle serait basée sur la régulation croisée des opérons qui va être discutée un peu plus loin (cf. section IV.2.3). En effet, étant donné la très forte hausse de transcription de l'opéron 2 et son impact stimulant sur l'opéron 1, il est possible qu'il compense le manque de HMAQ au niveau de l'activation de la transcription de l'opéron 1.

Bien sûr, une dernière hypothèse bien plus vaste est également envisageable. Elle concerne les différentes interactions existant entre tous les systèmes de QS. Il est tout à fait réaliste de penser qu'un système de régulation en compense un autre dans les mutants étudiés. Dans la Figure 43, les flèches sont indiquées en pointillé, signifiant qu'il existe probablement des intermédiaires qui peuvent aussi être régulés, et cela sans compter les autres éléments du réseau, encore inconnus, qui rassemble HmqR, les HMAQ et les opérons *rhl*.

Pour une étude plus complète, il serait nécessaire d'étudier la transcription des opérons pour chacun des mutants simples *btal*- et *btaR*-.

#### IV.2.2.2. Interaction des systèmes

Les quelques études réalisées sur les doubles, triples ou quadruples mutants ont apporté de nouvelles observations et révélé la complexité des interactions entre les systèmes de QS connus.

Si les systèmes de QS btaRI agissaient de façon indépendante sur les opérons, le triple mutant btaI1,2,3- aurait dû, en toute logique, présenter un profil de production de rhamnolipides sommant ceux des mutants simples btaI-. Pourtant, à DO équivalente, le triple mutant a révélé une production nettement supérieure à celle des mutants simples. Ceci signifie que l'effet global des systèmes de QS btaRI est une répression de la production des rhamnolipides. Cela suggère également que les trois systèmes, en plus d'avoir éventuellement un effet régulateur indépendant, sont interconnectés dans la régulation des opérons. Ceci n'est pas vraiment étonnant en considérant par exemple que BtaI2 produit deux types molécules de signalisation qui interagissent aussi bien avec BtaR2 qu'avec BtaR3 (cf. Figure 13 p. 46). De plus, certains travaux réalisés chez B. pseudomallei avaient démontré que les BpmR pouvaient former des homodimères et des hétérodimères et, dépendamment de la molécule de signalisation fixée,

réguler positivement ou négativement certains gènes (Kiratisin et Sanmee, 2008). Avec la quantité de signaux de QS possibles chez *B. thailandensis*, une étude similaire serait plus à même d'expliquer les différents profils observés et les régulations envisageables des opérons *rhl*.

Les doubles ou quadruple mutants impliquant HmqR ont tous subi un fort défaut de croissance ainsi qu'un grosse surproduction de rhamnolipides, exception faite de *hmqR-btal1*- dont la culture s'est arrêtée rapidement à cause de la mort des cellules (*cf.* Figure 26 p. 98). Les profils sont tous différents et originaux comparés à ceux du mutant *hmqR*- ou des mutants simples et triple *btal*-. Encore une fois, cela suggère qu'HmqR agirait davantage en parallèle des systèmes *btaRI*. Mais il n'est pas impossible que tous ces systèmes soient malgré tout reliés entre eux.

#### IV.2.2.3. HmqR, un régulateur majeur, direct?

Les observations précédentes ont conduit à envisager HmqR comme un répresseur majeur de la production de rhamnolipides, et plus particulièrement au niveau de l'opéron 2. Pourtant, malgré la mauvaise qualité des résultats obtenus par la technique du *pull down (cf. section III.4.1)*, il semblerait qu'HmqR puisse interagir avec la région promotrice prhlA1.

La technique du pull down par les régions promotrices fixées sur des billes magnétiques a été inspirée de l'expérience de Levros et al. (2010) avec de nombreuses modifications. Par manque de temps, la procédure et le matériel utilisés n'ont pas pu être optimisés, d'où la piètre qualité des résultats. Mais plusieurs améliorations peuvent être apportées. Tout d'abord, la production par PCR et la purification des séquences biotinylées dans les concentrations adéquates pour une bonne saturation des billes magnétiques ont été longues et fastidieuses, avec une grande perte de matériel. Ces étapes pourraient être remplacées par une synthèse complète des oligos directement biotinylés. Cela permettrait de gagner du temps, et d'augmenter la qualité et la quantité des ADN, tout en évitant la contamination par des amorces biotinylées libres. Il serait également plus propre de limiter la taille des ADN à 200 pb, car une trop longue séquence a tendance à fixer bien plus d'impuretés. Comme proposé dans l'article original (Levros et al., 2010), les longues séquences peuvent être découpées en plusieurs séquences de 200 pb qui se chevauchent. Par ailleurs, il serait plus efficace d'utiliser un kit pour les extractions protéiques ou, tout du moins, changer le système de lyse cellulaire (sonication) en le remplaçant par un tampon de lyse efficace ou par l'utilisation d'une presse. En effet, la densité cellulaire étant très importante pour B. thailandensis, la sonication n'est pas une technique assez puissante pour briser les cellules. En augmentant ainsi la concentration protéique par une meilleure extraction,

l'hybridation ADN-protéine pourrait être réalisée en une seule étape, évitant alors une perte de matériel non négligeable lors des rinçages des billes. Enfin, différents témoins pourraient être mis en place. Par exemple, après fixation de l'ADN sur les billes, il serait judicieux de vérifier leur saturation en ADN grâce, éventuellement, à des dépôts sur gel d'agarose des éluats contenant de moins en moins d'ADN (celui-ci se fixant sur les billes). Il faudrait également utiliser des témoins négatifs sur les billes pour confirmer une hybridation spécifique ADN-protéine (ADN étranger, eau à la place des protéines, etc.).

Concernant les résultats de cette expérience, bien que décevants, ils ont révélé la faible présence d'HmqR dans la bande n°1 (cf. Figure 34 p. 110). C'est la seule protéine à avoir été identifiée comme appartenant à *B. thailandensis*, toutes les autres n'étant même pas d'origine bactérienne. Il a été admis que, parmi toutes les protéines issues de *B. thailandensis*, la présence d'HmqR sur ce gel ne pouvait pas être due au hasard et une interaction assez puissante devait donc exister entre les régions promotrices et ce régulateur. Il est vrai que les rhamnolipides ne sont quasiment pas produits en milieu TSB comparativement au milieu NB + 4% glycérol, et c'est donc logique de retrouver un répresseur des opérons rhl dans les conditions « TSB ». Pourtant, étant donné son impact très important sur l'opéron 2, HmqR aurait dû davantage être retrouvé dans le puits voisin rassemblant les conditions « TSB-II ». Comme les analyses effectuées sur les bandes 2 à 6 correspondent à des protéines de l'échelle de poids moléculaire, il a été supposé que la migration avait dévié vers la gauche du gel. Ainsi, il se peut que les traces d'HmqR détectées dans la bande n°1 proviennent du puits voisin. Malheureusement, trop peu de matériel a été retrouvé dans tous les autres puits pour envisager leur analyse. Il manque donc ici beaucoup de données et de contrôles, positifs comme négatifs.

Que ce soit entre HmqR et prhlA1 ou prhlA2, pour vérifier si une réelle interaction existe, des systèmes hétérologues ont été créés et testés chez E. coli SM10 λpir (cf. section II.5.3). Malheureusement, les résultats n'ont révélé aucune interaction particulière. Cependant, il est important de rappeler qu'HmqR est un régulateur de type LysR, et qu'il nécessite donc probablement des ligands pour être actif (comme des molécules de signalisation par exemple). Comme E. coli SM10 λpir ne porte pas naturellement ce régulateur, il se peut qu'il manque plusieurs éléments à associer à HmqR pour que celui-ci soit efficace. Par ailleurs, aucune extraction d'ARNm n'a été réalisée sur ces systèmes hétérologues et il n'est donc pas possible d'affirmer qu'HmqR a réellement été exprimé.

Une expérience complémentaire a été réalisée sans donner de résultats intéressants. Elle a consisté à récupérer, par une extraction à l'acétate d'éthyle, les molécules extracellulaires d'une culture de *B. thailandensis* en milieu NB + 4% glycérol et TSB. Ces molécules ont ensuite été rajoutées aux

milieux de culture des systèmes hétérologues. Les résultats étaient trop peu reproductibles pour être pertinents, d'autant plus que certaines molécules extraites avaient un effet toxique pour *E. coli* SM10 λpir. Plutôt que de tester une éventuelle interaction par des systèmes hétérologues, il serait probablement plus pratique d'effectuer un EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Essay). Il serait dans ce cas nécessaire d'extraire les molécules, aussi bien extra qu'intracellulaires, de cultures de *B. thailandensis* pour visualiser si HmqR nécessite un ligand pour se fixer sur les régions promotrices. Malheureusement, par cette méthode, le ou les ligand(s) resterai(en)t inconnu(s). De manière plus ciblée, il est possible d'envisager des tester, toujours par EMSA, l'interaction entre HmqR et les régions promotrices mais en ajoutant spécifiquement les molécules de signalisation connues des systèmes de QS de *B. thailandensis*.

En conclusion, HmqR semble être un répresseur très important de la production de rhamnolipides, tandis qu'il est un activateur puissant de l'opéron des HMAQ. Étant donné que son rôle apparaît davantage central dans la régulation chez *B. thailandensis*, il serait plus approprié de le renommer afin qu'il ne soit pas exclusivement associé au système des HMAQ. Il apparait également indispensable d'en apprendre plus sur ce régulateur. Une modélisation tridimensionnelle et une analyse plus poussée de ses possibles interactions seraient probablement un atout pour comprendre son fonctionnement dans la cellule.

#### IV.2.2.4. Une régulation par un homologue de RhIR?

Une donnée intéressante issue des travaux de prédiction de promoteurs laisse supposer une régulation des opérons *rhl* par un régulateur transcriptionnel semblable à RhlR, donc de type LuxR. Ces prédictions ont été les plus proches des sites d'initiation de la transcription découverts par le 5'RACE. En effet, Virtual Footprint a permis de mettre en évidence des motifs ressemblant à ceux de *P. aeruginosa* et permettant une régulation par RhlR. Cependant, alors que ce dernier stimule la production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, la régulation chez *B. thailandensis* semble passer par divers systèmes de répression. Il pourrait être intéressant de vérifier si une réelle interaction existe entre RhlR et les régions promotrices de *B. thailandensis*. Par exemple, les rapporteurs pl-lacZ et pll-lacZ pourraient être testés chez *P. aeruginosa* et chez un mutant *rhlR*-. Bien que *B. thailandensis* ne possède pas d'homologue officiellement identifié de RhlR, un BLASTn du gène correspondant fait ressortir les cinq *btaR* connus, *btaR1* étant le premier homologue trouvé. Il est donc possible qu'une région qui serait

reconnue par RhIR soit en fait reconnue par un ou plusieurs BtaR, ce qui n'exclurait pas la possibilité que d'autres régulateurs, de structure semblable à RhIR, reconnaissent également cette région promotrice.

## IV.2.3. La régulation croisée des opérons

L'utilisation des rapporteurs a permis de démontrer une réelle interaction entre les opérons *rhl* dans la souche sauvage. En effet, les résultats présentés à la section III.3.3 indiquent que la suppression d'un des opérons induit une baisse importante ou un retard dans l'expression de cet opéron et de son paralogue. Ces résultats permettent d'expliquer ceux obtenus chez les mutants simples *rhlA*-, en termes de production de rhamnolipides, dans les travaux de Dubeau *et al.* (2009) : si la somme des productions des mutants simples n'égale pas celle de la souche sauvage, c'est parce qu'il existe une baisse de la transcription des opérons chez ces mutants. Cependant, il apparait que la suppression de l'opéron 2 a davantage d'impact que celle de l'opéron 1. Dans le premier cas, en plus d'avoir une très faible production de rhamnolipides, la transcription des deux opérons est fortement diminuée. À l'inverse, dans le deuxième cas, la production de rhamnolipides totale est bien meilleure et, malgré un retard, la transcription de l'opéron 2 finit par égaler celle de la souche sauvage. Cette particularité pourrait éventuellement être due à des produits dérivés de la transcription de chaque opéron.

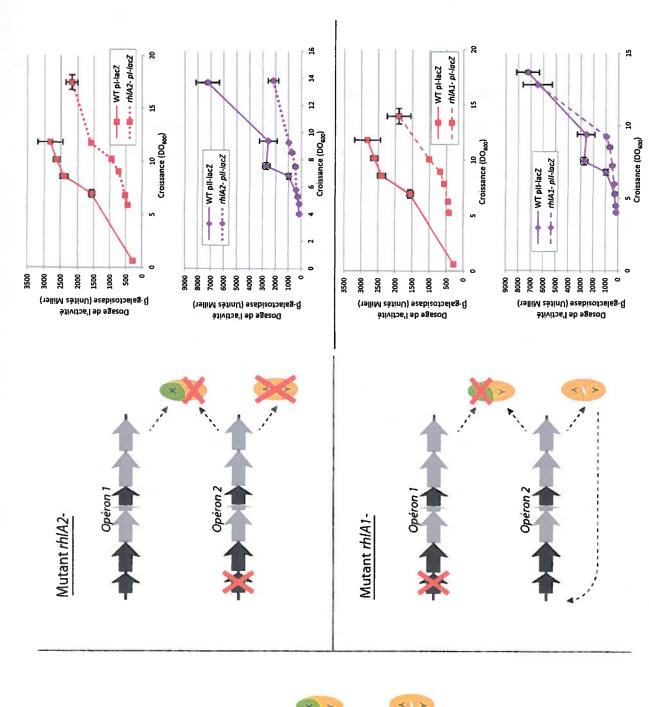
Cette hypothèse, illustrée dans la Figure 44, suppose que l'expression de l'opéron 1 aboutisse, entre autres, à l'expression d'un produit hypothétique X et celle de l'opéron 2, à un produit Y complémentaire. L'association de X et de Y assurerait la régulation positive des deux opérons. Mais les profils particuliers rencontrés pour le mutant *rhlA1*- laissent croire que le produit Y pourrait à lui seul stimuler la transcription de l'opéron 2 uniquement. Le retard de transcription observé dans ce cas serait alors dû à deux facteurs : le manque d'activation par le complexe X-Y et l'attente de la levée de répression sur l'opéron 2 par le QS. Par ailleurs, le produit Y ne pourrait pas réguler seul l'opéron 1 à cause de la différence de sensibilité des régions promotrices, possiblement due à des repliements différents et/ou une accessibilité fortement amoindrie.

Cette hypothèse souffre cependant de l'incohérence voulant qu'un opéron puisse aboutir à l'élaboration d'un produit X, tandis que son paralogue aboutisse au produit Y. En effet, les deux opérons étant 100% identiques, cette idée paraît moins plausible. Il a été envisagé que ces produits soient des petits ARN non codants inclus dans les régions promotrices. Mais les mutations ne touchant pas ces régions chez les mutants simples *rhlA*-, rien n'expliquerait qu'ils ne soient plus synthétisés. Enfin, il se peut que les autres gènes en cause dans les opérons, présentant des similitudes avec ceux d'E. coli

codant pour un système de pompe à efflux, soient en cause dans cette régulation croisée. La suppression d'un opéron se ferait donc au détriment de l'autre, soit directement à cause de ces « pompes » hypothétiques, soit *via* les produits qu'elles pourraient transporter. L'étude de mutants simples non polaires pour ces autres gènes pourrait permettre d'en apprendre davantage sur leur implication dans la régulation de la production des rhamnolipides.

Il est envisageable que le manque de reproductibilité de pl-lacZ soit encore une fois en cause et biaise les résultats. Pourtant, les profils de production de rhamnolipides (non montrés) sont cohérents et proportionnels aux profils de transcriptions de chacun des opérons par rapport à la souche sauvage, à savoir que le mutant *rhlA2*- ne produit que très peu de rhamnolipides quand le mutant *rhlA1*- réussit à générer plus de la moitié de la production de la souche sauvage.

L'expérience complémentaire sur l'impact de l'ajout initial de rhamnolipides avait pour but de vérifier si la stimulation croisée des opérons passait par les principaux produits de leur expression, à savoir les rhamnolipides. Il est apparu une très légère différence dans la production totale de rhamnolipides et dans la croissance quand la concentration de départ en Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> dans le milieu dépassait 100 ppm (cf. Figure 33 p. 108). Afin de vérifier si cette différence existe réellement, il faudrait éventuellement tester des concentrations plus importantes de rhamnolipides. Cependant, les trop faibles variations observées laissent penser que ces composés ne sont peut-être pas les principaux éléments impliqués dans la stimulation croisée des opérons. Pour en être sûr, il faudrait tester les rapporteurs chez les mutants simples rhlA- dans des milieux supplémentés en rhamnolipides afin de voir si le niveau de transcription de la souche sauvage est rétabli.



Souche sauvage

Figure 44: Schématisation de la régulation croisée des opérons chez B. thailandensis et chez les mutants polaires rh1A1- et rh1A2-. Les profils de transcription associés aux rapporteurs pour chaque mutant sont également affichés (cf. Figure 32). X : produit issu de la transcription de l'opéron 1. Y : produit issu de la transcription de l'opéron 2.

### IV.2.3.1. La régulation dans le temps

Au cours d'une culture, il est apparu que l'opéron 1 était transcrit de façon quasi continue, de façon plutôt proportionnelle à la croissance. À l'inverse, l'opéron 2 présente un profil de transcription retardée caractéristique d'une activation par le QS. Il serait plus juste de parler ici de levée de répression car il semblerait que les systèmes de régulation des opérons *rhl* passent globalement par des répresseurs, tel HmqR, et non des activateurs. En combinant ces résultats avec ceux des expériences précédemment évoquées, il est possible de proposer une hypothèse quant à l'expression des opérons *rhl* au fil d'une culture.

Avant l'activation du QS, quand la densité cellulaire est encore basse, l'opéron 2 ne serait que très faiblement transcrit car il subirait une répression importante, majoritairement via HmqR et BtaR3. Comme l'opéron 1 semble moins sensible à cette répression et au QS en général, il serait quant à lui exprimé dès le début de la culture, permettant alors à la bactérie de démarrer sa production de rhamnolipides. Lors de l'activation du QS, les répressions sur l'opéron 2 seraient levées et, éventuellement stimulé par les produits (plus ou moins directs) issus de l'opéron 1, il serait alors fortement transcrit. L'hypothèse principale expliquant cette différence de sensibilité des opérons au QS est basée sur les repliements différents des régions intergéniques qui favoriseraient ou empêcheraient l'accès de certains régulateurs.

Depuis les résultats préliminaires présentés en section 1.3.3.1, une des hypothèses est que l'opéron 2 contribue davantage à la production totale de rhamnolipides que l'opéron 1. Les différentes analyses effectuées sur la transcription des opérons permettent de renforcer fortement cette hypothèse sans pouvoir totalement l'affirmer. En effet, les rapporteurs étant portés par des plasmides, ceux-ci permettent de suivre qualitativement l'évolution de la transcription des gènes concernés, mais pas quantitativement. Pour éviter ce problème, il serait nécessaire d'utiliser un rapporteur construit sur un vecteur intégratif. De cette manière, le génome de la bactérie ne porterait qu'une seule copie du rapporteur, et ce de façon stable. Cette solution avait été essayée en premier lieu, avant l'utilisation des plasmides, par le biais du vecteur mini-CTX-lacZ. Ce vecteur intégratif, portant une cassette de résistance à la tétracycline qui pouvait par la suite être flipée, pouvait s'insérer dans le chromosome I de B. thailandensis. Cependant, le vecteur vide générait un bruit de fond de plus de 10 000 Unités Miller et les rapporteurs, construits de la même façon qu'avec pMCG11, ne fonctionnaient pas : aucune activité β-galactosidase n'était détectée.

## IV.2.3.2. L'implication des autres éléments des opérons

Comme évoqué en section IV.1.1, la très bonne conservation du contexte génomique des régions rhl laisse croire que les autres gènes inclus dans les opérons de B. thailandensis possèdent un rôle particulier assez important. Ces gènes présenteraient des homologies avec ceux impliqués dans le complexe de résistance par efflux actif d'E. coli, aussi appelé « complexe EmrAB », illustré en Figure 45 (Nichayapun, 2005).

# 

Figure 45: Schématisation du complexe EmrAB d'E. coli et des gènes codant homologues chez B. thailandensis. OM: Outer Membrane, OMP: Outer Membrane Protein, CM: Cell Membrane, H\*: proton.

De plus, des séquences codantes pour une petite protéine hypothétique ainsi qu'une OMP à la fonction inconnue sont aussi présentes. Sans que la stimulation croisée entre les opérons soit forcément directe, elle pourrait nécessiter l'expression de ces autres gènes. Des mutations non polaires seraient plus à même de tester l'importance de ces gènes dans la régulation de la production des rhamnolipides.

## IV.2.4. Autres facteurs importants à prendre en compte, résultats du criblage

#### IV.2.4.1. Discussion sur la méthode de criblage

La technique de mutagénèse aléatoire par transposon permet de générer de grandes quantités de mutants dont certains révèlent des profils d'expression de la β-galactosidase (et donc de la transcription des gènes *rhl*) amoindris ou, au contraire, amplifiés. Les essais de criblage menés dans cette étude ont permis de démontrer que celui-ci est possible en utilisant les rapporteurs pl-*lacZ* et pll-*lacZ*. La présélection des transposants sur gélose nécessite de la pratique pour différencier les profils réellement différents de la majorité des colonies. En effet, la couleur et la forme de ces colonies évoluant dans le temps, il n'est pas évident de repérer les profils « Clairs ». Certains transposants produisant naturellement un pigment jaune, la coloration bleue s'en trouve modifiée et plusieurs teintes de bleu, allant parfois jusqu'au vert, ont pu être observées. Cette difficulté ne doit pas altérer l'observation sur l'intensité de la couleur, ce qui n'est pas chose aisée. Les profils « Nuls » ou « Foncés » sont plus faciles à identifier mais la taille des colonies pour cette dernière catégorie biaise parfois le jugement : elles sont souvent plus petites que les autres et la coloration bleue y est donc logiquement plus intense. C'est pour cette raison qu'il est important de suivre l'évolution de la coloration sur plusieurs jours.

Les colonies blanches sont les plus facilement repérables et ont toutes intégré la catégorie « Nuls ». Une très grande proportion de ces mutants touchait directement le gène *lacZ*. Cela est cohérant avec les profils observés à la fois sur gélose et en culture liquide. La β-galactosidase ne pouvant être produite, le X-gal ou l'ONPG ne peuvent être scindés ce qui explique l'absence de coloration. Cependant, pour certains transposants, le profil « Nuls » ne semble pas dû à l'altération du gène *lacZ*. Pour cette raison, il est important de continuer à sélectionner, tester et séquencer les mutants de cette catégorie.

Puisque ces expériences demandent beaucoup de temps, les transposants n'ont pas été criblés une deuxième fois sur gélose et n'ont été testés qu'en unique réplica en culture liquide. Étant donné le manque de reproductibilité sur gélose pour la souche sauvage portant les rapporteurs, il n'est probablement pas indispensable d'effectuer un second criblage sur milieu solide. En revanche, il serait plus sage de tester à nouveau les mutants les plus intéressants en culture liquide en triplicata, et de suivre leur production de rhamnolipides par la même occasion. Par ailleurs, étant donné les difficultés rencontrées lors du séquençage, il serait plus judicieux de vérifier les sites d'insertion des transposons en effectuant des PCR spécifiques aux régions génomiques concernées.

### IV.2.4.2. Les résultats du criblage

Dans ces travaux, le début du criblage n'a été effectué que pour confirmer la validité des rapporteurs et de la méthode employés. Il est nécessaire de le poursuivre sur quelques dizaines de milliers de transposants pour élargir et confirmer l'importance de certains gènes. En effet, c'est la redondance de résultats qui permet, dans cette technique, de souligner le lien entre les gènes affectés et la régulation des opérons *rhl*.

Certains résultats peuvent laisser penser que le transposon *HimarBP3* pourrait avoir des sites préférentiels d'insertion. Par exemple, pour le mutant II-16 (catégorie « Nuls »), le transposon s'est inséré entre deux gènes convergeant dont l'un (BTH\_II2003) code pour une « Transposon Tn2501 resolvase ». Ceci pourrait juste correspondre à un site préférentiel d'insertion pour le transposon *HimarBP3*. De la même manière, le séquençage effectué sur le mutant I-14 (catégorie « Clairs ») a indiqué une insertion dans un gène codant pour ISBma1, une transposase. Encore une fois, il est possible qu'une recombinaison homologue aie eu lieu entre pHBurk3 (portant le transposon *HimarBP3*) et cette transposase.

Néanmoins, certains mutants ont déjà démontré des profils assez largement différents de la souche sauvage pour être étudiés plus en profondeur. C'est notamment le cas des transposants I-95, I-96 et II-16 de la catégorie « non-producteurs », ainsi que les transposants I-16, II-28, II-34 et II-36 de la catégorie des « surproducteurs ». Ils affectent des gènes codant pour des protéines aux fonctions variées : protéines hypothétiques, protéines de fixation à l'ADN, ou éléments majeurs du métabolisme de la cellule (ARN ribosomal 55, ADN primase, acétyltransférase). Le lien entre ces gènes et la régulation de la production de rhamnolipides n'est pas évident et nécessite des études plus approfondies. Cependant les profils extrêmes des mutants sous-entendent un lien assez puissant. Mais avant tout, il est essentiel de vérifier la corrélation entre leurs profils de production de la β-galactosidase et celle de rhamnolipides.

Il est bon de souligner que plusieurs transposants présentent des défauts de croissance plus ou moins marqués. Malgré tout, ils ont été sélectionnés car leurs défauts de croissance ont été pris en compte lors du calcul du rapport T. Comme il va en être discuté dans la section suivante, il se pourrait même que les défauts de croissance soient liés à la surproduction de rhamnolipides.

## IV.3. LE COÛT ÉNERGÉTIQUE DE LA PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES

Une constatation singulière a été faite au travers des multiples cinétiques réalisées. Elle concerne les défauts de croissance observés pour les mutants ou transposants surproducteurs de rhamnolipides. À l'inverse, une souche produisant moins de rhamnolipides que la souche sauvage avait tendance à mieux croître. Le graphique présenté en Figure 46 illustre cette observation et a été élaboré comme suit. Pour chaque mutant et chaque cinétique présentés en section III.2, deux courbes séparées ont été établies : la croissance et la production de rhamnolipides en fonction du temps. Deux valeurs ont alors été extraites à partir du coefficient « a » des droites de régression linéaire (y=ax+b) de ces courbes : la vitesse globale de croissance et la vitesse globale de production de rhamnolipides. Ces deux valeurs correspondent aux deux coordonnées d'un point sur le graphique de la Figure 46. Pour chacune des deux valeurs, le coefficient de corrélation (R² compris entre 0 et 1) a été relevé. Il est illustré sur ce même graphique par les barres d'erreur calculées de la façon suivante :

$$erreur = (1 - R^2) * a$$

Avec: a = vitesse de croissance ou vitesse de production de rhamnolipides

R<sup>2</sup> = coefficient de corrélation associé

La question s'est alors posée de savoir si un lien direct existait entre la croissance et la production de surfactant, et si tel était le cas, est-ce que l'un des deux phénomènes induisait l'autre.

La première hypothèse a été de considérer une éventuelle toxicité des rhamnolipides sur les cellules productrices, étant donné les hautes concentrations en surfactants sécrétés. L'expérience présentée en section III.3.3.1 a permis d'écarter cette hypothèse. L'ajout de rhamnolipides dans le milieu de culture n'a pas induit de retard de croissance mais a, au contraire, semblé favoriser les bactéries.

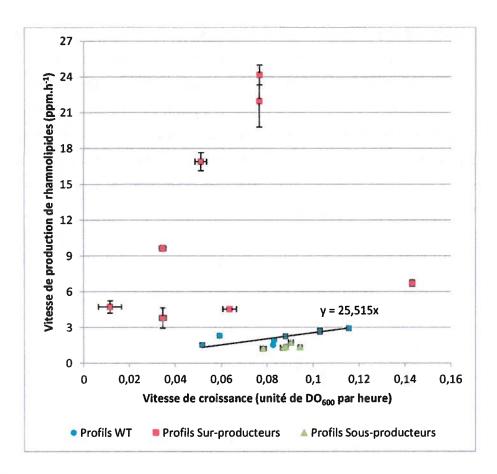


Figure 46: Graphique résumant les vitesses de production de rhamnolipides en fonction des vitesses de croissance pour des cinétiques réalisées avec B. thailandensis (souche sauvage = WT) et quelques uns des mutants de cette souche.

Durant les cinétiques, certains mutants présentaient des profils sous-producteurs (triangles verts) ou surproducteurs (carrés rouges) de rhamnolipides, tandis que d'autres ne différaient pas du profil WT (ronds bleus). La régression linéaire a été appliquée sur les données des profils WT.

Une seconde proposition a donc été envisagée : celle du coût énergétique de production des biosurfactants. En théorie, les rhamnolipides sont des métabolites secondaires produits lorsque la bactérie est entrée en phase stationnaire. Une étude récente a conclu que *P. aerug*inosa régulait l'expression des gènes *rhlAB* pour assurer une sécrétion massive de biosurfactants uniquement lorsque leur coût énergétique de production était minimum, c'est-à-dire en phase stationnaire (Xavier *et al.*, 2011). Ils ont également démontré qu'une induction prématurée de la production de rhamnolipides conduisait à un léger ralentissement de croissance des bactéries, mais seulement en phase exponentielle, le niveau final de la DO<sub>600</sub> en phase stationnaire étant identique. Des résultats publiés par Déziel *et al.* (2003) soutenaient aussi que fournir un substrat qui ne permet pas une croissance rapide

favorise la production de rhamnolipides. Il existerait donc bien un coût énergétique pour la cellule, et celui-ci deviendrait minimal en phase stationnaire, mais les conséquences sur la croissance restent relativement faibles pour *P. aeruginosa*. Contrairement à cette bactérie, la phase stationnaire de *B. thailandensis* en milieu NB + 4% glycérol n'en est pas tout à fait une. En effet, après sa phase exponentielle, cette bactérie possède la particularité de croître quasiment continuellement et atteint des densités de population très élevées (*cf.* Figure 47). De ce fait, si la production de rhamnolipides induit un coût énergétique important, il parait logique qu'une surproduction de biosurfactants affecte la croissance de la bactérie tout au long de la culture.

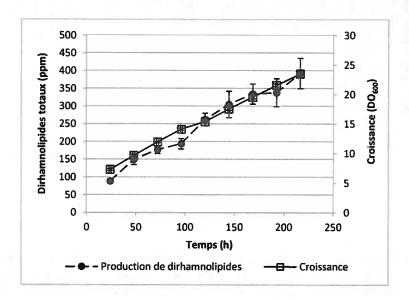


Figure 47: Croissance et production de dirhamnolipides totaux de B. thailandensis E264 en milieu NB + 4% glycérol.

L'hypothèse principale reliant les profils de croissance à la production de surfactants serait donc basée sur le coût énergétique de la synthèse des rhamnolipides. Aucune expérience réalisée dans ce mémoire n'avait pour but de répondre à cette hypothèse qui reste donc en suspens. Plusieurs expériences pourraient être réalisées pour tenter d'y répondre. Selon l'exemple des travaux de Xavier et al. (2011), il serait intéressant d'analyser l'impact sur la croissance de l'ajout d'un opéron rhl inductible chez un double mutant rhlA1,2-. Sa production de rhamnolipides étant alors maitrisée, une corrélation entre la croissance et la production de biosurfactants serait peut-être plus facile à définir. Une autre expérience intéressante serait d'observer les changements des taux de croissance en faisant varier les conditions environnementales, comme par exemple la température ou la source de carbone.

Un dernier paramètre est à prendre en compte dans les défauts de croissance observés et la surproduction de rhamnolipides : le suivi du pH. Ce contrôle n'a été effectué dans aucune des cultures et

cinétiques réalisées dans cette étude, ce qui représente une lacune importante. Les cellules, aussi bien pour leur croissance que pour leur production de rhamnolipides, dépendent fortement de ce paramètre, comme il a été évoqué dans la section 1.2.3. C'est pourquoi il serait nécessaire d'effectuer de telles mesures lors de cinétiques sur la souche sauvage et des mutants surproducteurs de rhamnolipides.

# **CONCLUSION**

L'ensemble des résultats semblent indiquer que le QS agit globalement comme répresseur de la production des rhamnolipides chez *B. thailandensis*, alors qu'il est activateur chez *P. aeruginosa*. HmqR, quant à lui, réprimerait principalement l'opéron 2, ayant peu d'impact sur le premier opéron. Bien que certaines observations laissent croire à une interaction directe entre HmqR et les régions promotrices, des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier ces résultats.

Sans avoir le profil de régulation complet, il apparait également que les deux opérons possèdent effectivement une stimulation croisée qui dépend de l'avancée de la culture et qui doit probablement passer par d'autres signaux du QS. L'hypothèse principale proposée, pour expliquer la différence de régulation de chaque opéron, voudrait que la haute teneur en G:C des régions promotrices induise des repliements qui favorisent, ou défavorisent la fixation des éléments nécessaires à la transcription.

La complexité du QS et la multitude des éléments de régulation, en plus de la difficulté technique induite par la présence de deux opérons paralogues, ne permet pas réellement d'élucider tous les mystères de leur régulation chez *B. thailandensis*. Néanmoins, ces travaux apportent de nouveaux outils et soulèvent des hypothèses plus ciblées. Les perspectives évoquées dans la section précédente sont nombreuses et demanderaient à être toutes investiguées. C'est plus particulièrement le cas de l'éventuelle interaction entre HmqR et les régions promotrices, ainsi que du criblage des transposants qui pourrait certainement permettre d'en apprendre davantage sur les régulateurs directs des opérons. L'approfondissement des études bioinformatiques, avec l'enrichissement continuel des bases de données, devrait également conduire à une meilleure compréhension du système global de régulation des opérons *rhl*.

Bien qu'initiatiques, les travaux débutés dans ce projet demandent donc à être poursuivis et approfondis car maîtriser la production de rhamnolipides chez une espèce non pathogène comme *B. thailandensis* reste une alternative prometteuse, non seulement face aux tensioactifs synthétiques, mais également face aux biosurfactants produits par des batcéries pathogènes comme *P. aeruginosa*.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- ABALOS, A., PINAZO, A., INFANTE, M. R., CASALS, M., GARCÍA, F. ET MANRESA, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17 (5): 1367-1371.
- ABDEL-MAWGOUD, A., LÉPINE, F. ET DÉZIEL, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5): 1323-1336.
- ABDEL-MAWGOUD, A., LEPINE, F. ET DEZIEL, É. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* uses beta-oxidation intermediates as precursors for biosynthesis of rhamnolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. Soumis.*
- ABOUSEOUD, M., YATAGHENE, A., AMRANE, A. ET MAACHI, R. (2008). Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35 (11): 1303-1308.
- AGARWAL, A., KAHYAOGLU, C. ET HANSEN, D. B. (2012). Characterization of HmqF, a protein Involved in the biosynthesis of unsaturated quinolones produced by *Burkholderia thailandensis*. *Biochemistry* 51 (8): 1648-1657.
- AL-TAHHAN, R. A., SANDRIN, T. R., BODOUR, A. A. ET MAIER, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3262-3268.
- ALOUSH, V., NAVON-VENEZIA, S., SEIGMAN-IGRA, Y., CABILI, S. ET CARMELI, Y. (2006). Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50 (1): 43-48.
- ANDRÄ, J., RADEMANN, J., HOWE, J., KOCH, M. H., HEINE, H., ZAHRINGER, U. ET BRANDENBURG, K. (2006). Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biological Chemistry* 387 (3): 301-310.
- ARCHIBALD, L., PHILLIPS, L., MONNET, D., MCGOWAN, J. E., TENOVER, F. ET GAYNES, R. (1997). Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases* 24 (2): 211-215.
- ARINO, MARCHAL ET VANDECASTEELE (1998). Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas* aeruginosa in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Journal of Applied Microbioly* 84 (5): 769-776.
- ASHDOWN, L. R. (1979). Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Pathology* 32 (5): 500-504.

- AUNG, M. K., ET MAR, T. T. (2008). Re-emergence of melioidosis in Myanmar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 Suppl 1: S10-11.
- BALLARD, R. W., PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M., STANIER, R. Y. ET MANDEL, M. (1970). Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia, P. marginata, P. alliicola* and *P. caryophylli. Journal of General Microbiology* 60 (2): 199-214.
- BARKAY, T., NAVON-VENEZIA, S., RON, E. Z. ET ROSENBERG, E. (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2697-2702.
- BEAL, R., ET BETTS, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* 89 (1): 158-168.
- BECHER, P. (1965). Emulsions: theory and practice. Reinhold, New York.
- BÉDARD, M., MCCLURE, C. D., SCHILLER, N. L., FRANCOEUR, C., CANTIN, A. ET DENIS, M. (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9 (4): 455-462.
- BEEBE, J. L., ET UMBREIT, W. W. (1971). Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology* 108 (1): 612-614.
- BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I. ET MANRESA, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85 (1): 1-8.
- BERGMANN, U., SCHEFFER, J., KÖLLER, M., SCHÖNFELD, W., ERBS, G., MÜLLER, F. E. ET KÖNIG, W. (1989). Induction of inflammatory mediators (histamine and leukotrienes) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by *Pseudomonas aeruginosa* strains from burn patients. *Infection and Immunity* 57 (7): 2187-2195.
- BERGSTRÖM, S., THEORELL, H. ET DAVIDE, H. (1946). On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. *Arkiv for Kemi Mineralogi och Geologi* 23 (A): 1-12.
- BERNHEIMER, A. W., ET AVIGAD, L. S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus* subtilis. Journal of General Microbiology 61 (3): 361-369.
- BOCCARD, F., ESNAULT, E. ET VALENS, M. (2005). Spatial arrangement and macrodomain organization of bacterial chromosomes. *Molecular Microbiology* 57 (1): 9-16.
- BOLES, B. R., THOENDEL, M. ET SINGH, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57 (5): 1210-1223.
- BOOTHROYD, B., THORN, J. A. ET HASKINS, R. H. (1956). Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago* sp. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 34 (1): 10-14.

- BOUCHEZ-NAÏTALI, M., ET VANDECASTEELE, J.-P. (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.
- BOUCHEZ NAÏTALI, M., RAKATOZAFY, H., MARCHAL, R., LEVEAU, J. Y. ET VANDECASTEELE, J. P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology* 86 (3): 421-428.
- BOUSSEY-CONTROL. Site de Boussey Control. Page web consultée le 4 mars 2011. URL: http://www.boussey-control.com/tension-superficielle/tension-superficielle.htm
- BRACKMANN, B., ET HAGER, C.-D. (2004). The statistical world of raw materials, fatty alcohols and surfactants, présenté à Berlin lors de la conférence: 6th World Surfactant Congress.
- BRETT, P. J., DESHAZER, D. ET WOODS, D. E. (1997). Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiology & Infection* 118 (2): 137-148.
- BRETT, P. J., DESHAZER, D. ET WOODS, D. E. (1998). Note: Burkholderia thailandensis sp. nov., a Burkholderia pseudomallei-like species. International Journal of Systematic Bacteriology 48 (1): 317-320.
- BURGER, M. M., GLASER, L. ET BURTON, R. M. (1963). The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 238 (8): 2595-2602.
- 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., MERRITT, J. H., BROTHERS, K. M. ET O'TOOLE, G. A. (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 189 (9): 3603-3612.
- CAIAZZA, N. C., SHANKS, R. M. Q. ET O'TOOLE, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187 (21): 7351-7361.
- CHANDLER, J. R., DUERKOP, B. A., HINZ, A., WEST, T. E., HERMAN, J. P., CHURCHILL, M. E. A., SKERRETT, S. J. ET GREENBERG, E. P. (2009). Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis quorum sensing* and self-aggregation. *Journal of Bacteriology* 191 (19): 5901-5909.
- CHEN, J., ET XIE, J. (2011). Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (10): 2694-2702.
- CHENG, A. C., ET CURRIE, B. J. (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clinical Microbiology Reviews 18 (2): 383-416.
- CHIARINI, L., BEVIVINO, A., DALMASTRI, C., TABACCHIONI, S. ET VISCA, P. (2006). *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology* 14 (6): 277-286.
- CHRZANOWSKI, Ł., ŁAWNICZAK, Ł. ET CZACZYK, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? World Journal of Microbiology and Biotechnology 28 (2): 401-419.

- CHRZANOWSKI, Ł., WICK, L. Y., MEULENKAMP, R., KAESTNER, M. ET HEIPIEPER, H. J. (2009). Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Letters in Applied Microbiology* 48 (6): 756-762.
- CIRIGLIANO, M. C., ET CARMAN, G. M. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 48 (4): 747-750.
- CIRIGLIANO, M. C., ET CARMAN, G. M. (1985). Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 50 (4): 846-850.
- COENYE, T., ET VANDAMME, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5 (9): 719-729.
- COENYE, T., VANDAMME, P., GOVAN, J. R. W. ET LIPUMA, J. J. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (10): 3427-3436.
- CONWAY, B. A., ET GREENBERG, E. P. (2002). Quorum sensing signals and quorum sensing genes in Burkholderia vietnamiensis. Journal of Bacteriology 184 (4): 1187-1191.
- COOPER, D. G., ET PADDOCK, D. A. (1983). Torulopsis petrophilum and surface-activity. Applied and Environmental Microbiology 46 (6): 1426-1429.
- COOPER, D. G., ZAJIC, J. ET DENIS, C. (1981). Surface active properties of a biosurfactant from Corynebacterium lepus. Journal of the American Oil Chemists' Society 58 (1): 77-80.
- COOPER, D. G., ZAJIC, J. E. ET GERSON, D. F. (1979). Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. Applied and Environmental Microbiology 37 (1): 4-10.
- COSTA, S., LÉPINE, F., MILOT, S., DÉZIEL, E., NITSCHKE, M. ET CONTIERO, J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 (8): 1063-1072.
- COSTA, S. G. V. A. O., DÉZIEL, E. ET LÉPINE, F. (2011). Characterization of rhamnolipid production by Burkholderia glumae. Letters in Applied Microbiology 53 (6): 620-627.
- DANCE, D. A. (2000). Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human-animal hosts. *Acta Tropica* 74 (2-3): 159-168.
- DAVEY, M. E., CAIAZZA, N. C. ET O'TOOLE, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185 (3): 1027-1036.
- DE BRUIJN, I., ET RAAIJMAKERS, J. M. (2009). Diversity and functional analysis of LuxR-Type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. Applied and *Environmental Microbiology* 7.5 (14): 4753-4761.
- DEKIMPE, V., ET DEZIEL, E. (2009). Revisiting the *quorum sensing* hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155 (Pt 3): 712-723.

- DESAI, J. D., ET BANAT, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61 (1): 47-64.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., DENNIE, D., BOISMENU, D., MAMER, O. A. ET VILLEMUR, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1440 (2-3): 244-252.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S., HE, J., MINDRINOS, M. N., TOMPKINS, R. G. ET RAHME, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101 (5): 1339-1344.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S. ET VILLEMUR, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1485 (2-3): 145-152.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S. ET VILLEMUR, R. (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.
- DIGGLE, S. P., LUMJIAKTASE, P., DIPILATO, F., WINZER, K., KUNAKORN, M., BARRETT, D. A., CHHABRA, S. R., CÁMARA, M. ET WILLIAMS, P. (2006). Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chemistry and biology* 13 (7): 701-710.
- DOGGETT, R. G., HARRISON, G. M. ET WALLIS, E. S. (1964). Comparison of some properties of *Pseudomonas* aeruginosa isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology* 87 (2): 427-431.
- DUBEAU, D. (2009). Étude de la production de rhamnolipides par *Burkholderia*, Mémoire de Maîtrise à l'INRS Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval.
- DUBEAU, D., DÉZIEL, E., WOODS, D. ET LÉPINE, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology* 9 (1): 263.
- DUERKOP, B. A., HERMAN, J. P., ULRICH, R. L., CHURCHILL, M. E. A. ET GREENBERG, E. P. (2008). The *Burkholderia* mallei BmaR3-Bmal3 quorum sensing system produces and responds to N-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone. *Journal of Bacteriology* 190 (14): 5137-5141.
- DUERKOP, B. A., ULRICH, R. L. ET GREENBERG, E. P. (2007). Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-Bmal1 *quorum sensing*. *Journal of Bacteriology* 189 (14): 5034-5040.
- DUERKOP, B. A., VARGA, J., CHANDLER, J. R., PETERSON, S. B., HERMAN, J. P., CHURCHILL, M. E. A., PARSEK, M. R., NIERMAN, W. C. ET GREENBERG, E. P. (2009). *Quorum sensing* control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of Bacteriology* 191 (12): 3909-3918.

- DUMAIS, J.-P. (2010). Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez *Burkholderia ambifaria* et *B. thailandensis*, Mémoire de Maîtrise à INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, Laval.
- DUNLAP, P. V. (1999). Quorum regulation of luminescence in Vibrio fischeri. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1 (1): 5-12.
- EBERL, L. (2006). Quorum sensing in the genus Burkholderia. International Journal of Medical Microbioly 296 (2-3): 103-110.
- EDGAR, R. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5 (1): 113.
- EDWARDS, J. R., ET HAYASHI, J. A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 111 (2): 415-421.
- ESPELI, O., MERCIER, R. ET BOCCARD, F. (2008). DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Molecular Microbiology* 68 (6): 1418-1427.
- ESPINOSA-URGEL, M. (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. Journal of Bacteriology 185 (3): 699-700.
- EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature Genus Burkholderia. Page web consultée le 13/09/2012. URL: http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html
- FATTOM, A., ET SHILO, M. (1985). Production of emulcyan by *Phormidium J-1*: its activity and function. *FEMS Microbiology Letters* 31 (1): 3-9.
- FLORET, N., BERTRAND, X., THOUVEREZ, M. ET TALON, D. (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*: origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie* 57 (1): 9-12.
- FUQUA, C. (2006). The QscR quorum sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *Journal of Bacteriology* 188 (9): 3169-3171.
- FUQUA, C., WINANS, S. C. ET GREENBERG, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of *quorum sensing* transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* 50 (1): 727-751.
- GEORGE, A. M., JONES, P. M. ET MIDDLETON, P. G. (2009). Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. FEMS Microbiology Letters 300 (2): 153-164.
- GEORGIOU, G., LIN, S.-C. ET SHARMA, M. M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Nature Biotechnology* 10 (1): 60-65.
- GESSARD, C. (1884). On the blue and green coloration that appears on bandages. *Review of Infectious Diseases* 6 (3): S775-S776.

- GILBERT, K. B., KIM, T. H., GUPTA, R., GREENBERG, E. P. ET SCHUSTER, M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* transcription factor LasR. *Molecular Microbiology* 73 (6): 1072-1085.
- GOBBERT, U., LANG, S. ET WAGNER, F. (1984). Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis-Bombicola*. Biotechnology Letters 6 (4): 225-230.
- GOTSCHLICH, A., HUBER, B., GEISENBERGER, O., TOGL, A., STEIDLE, A., RIEDEL, K., HILL, P., TUMMLER, B., VANDAMME, P., MIDDLETON, B., CAMARA, M., WILLIAMS, P., HARDMAN, A. ET EBERL, L. (2001). Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. Systematic and Applied Microbioly 24 (1): 1-14.
- GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O. ET FIECHTER, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology* 48 (2): 301-305.
- GUERRA-SANTOS, L. H., KÄPPELI, O. ET FIECHTER, A. (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., NUÑEZ, A., FETT, W. ET SOLAIMAN, D. K. Y. (2005). Production of rhamnolipids by Pseudomonas chlororaphis, a nonpathogenic bacterium. Applied and Environmental Microbiology 71 (5): 2288-2293.
- HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., ESPUNY, M. J., INFANTE, M. R. ET MANRESA, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (3): 316-322.
- HARAGA, A., WEST, T. E., BRITTNACHER, M. J., SKERRETT, S. J. ET MILLER, S. I. (2008). Burkholderia thailandensis as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of Burkholderia pseudomallei. Infection and Immunity 76 (11): 5402-5411.
- HARGREAVES, T. (2003). Surfactants: the ubiquitous amphiphiles. Chemical Society, London.
- HARLEY, V. S., DANCE, D. A., DRASAR, B. S. ET TOVEY, G. (1998). Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukaryotic cells in tissue culture. *Microbios* 96 (384): 71-93.
- HARSHEY, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology* 57 (1): 249-273.
- HAUSER, G., ET KARNOVSKY, M. L. (1957). Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas* aeruginosa. Journal of Biological Chemistry 224 (1): 91-105.
- HAUSER, G., ET KARNOVSKY, M. L. (1958). Studies on the biosynthesis of L-rhamnose. *Journal of Biological Chemistry* 233 (2): 287-291.
- HÄUSSLER, S., NIMTZ, M., DOMKE, T., WRAY, V. ET STEINMETZ, I. (1998). Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity* 66 (4): 1588-1593.

- HAYNES, W. C., ET BURKHOLDER, W. H. (1957). The genus *Pseudomonas*, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., édité par Breed R. S., Murray E. G. D. et Smith N. R. . Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- HEEB, S., FLETCHER, M. P., CHHABRA, S. R., DIGGLE, S. P., WILLIAMS, P. ET CÁMARA, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiology Reviews* 35 (2): 247-274.
- HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., GONEZ, J. ET HELDIN, C. H. (1995). Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224 (1): 451-455.
- HEWALD, S., JOSEPHS, K. ET BOLKER, M. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. Applied and Environmental Microbiology 71 (6): 3033-3040.
- HEYD, M., KOHNERT, A., TAN, T. H., NUSSER, M., KIRSCHHÖFER, F., BRENNER-WEISS, G., FRANZREB, M. ET BERENSMEIER, S. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (5): 1579-1590.
- HINGLEY, S. T., HASTIE, A. T., KUEPPERS, F., HIGGINS, M. L., WEINBAUM, G. ET SHRYOCK, T. (1986). Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infection and Immunity* 51 (1): 254-262.
- HISATSUKA, K., NAKAHARA, T., SANO, N. ET YAMADA, K. (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry* 35 (5): 686-&.
- HOMMEL, R., STUWER, O., STUBER, W., HAFERBURG, D. ET KLEBER, H. P. (1987). Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 (3): 199-205.
- HOST, S., ET ROCHER, M. (2001). Tensioactifs et oléagineux : Étude sur les matières premières oléagineuses disponibles sur le marché européen pour la production de tensioactifs, pp. 1-77, édité par l'ADEME.
- HUBER, B., FELDMANN, F., KOTHE, M., VANDAMME, P., WOPPERER, J., RIEDEL, K. ET EBERL, L. (2004). Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity* 72 (12): 7220-7230.
- HUBER, B., RIEDEL, K., HENTZER, M., HEYDORN, A., GOTSCHLICH, A., GIVSKOV, M., MOLIN, S. ET EBERL, L. (2001). The cep quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147 (9): 2517-2528.
- Intelligence, A. M. (Editor), 2008. World surfactant market, Ratingen, Germany.
- ITOH, S., HONDA, H., TOMITA, F. ET SUZUKI, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub>). *The journal of antibiotics* 24 (12): 855-859.
- ITOH, S., ET SUZUKI, T. (1972). Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in *n*-paraffin-utilizing ability. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 2233-2235.

- JACOBS, M. A., ALWOOD, A., THAIPISUTTIKUL, I., SPENCER, D., HAUGEN, E., ERNST, S., WILL, O., KAUL, R., RAYMOND, C., LEVY, R., CHUN-RONG, L., GUENTHNER, D., BOVEE, D., OLSON, M. V. ET MANOIL, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24): 14339-14344.
- JARVIS, F. G., ET JOHNSON, M. J. (1949). A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71 (12): 4124-4126.
- JAVAHERI, M., JENNEMAN, G. E., MCINERNEY, M. J. ET KNAPP, R. M. (1985). Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology* 50 (3): 698-700.
- JENSEN, P. Ø., BJARNSHOLT, T., PHIPPS, R., RASMUSSEN, T. B., CALUM, H., CHRISTOFFERSEN, L., MOSER, C., WILLIAMS, P., PRESSLER, T., GIVSKOV, M. ET HØIBY, N. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by *quorum sensing*-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153 (5): 1329-1338.
- KACZOREK, E., CHRZANOWSKI, Ł., PIJANOWSKA, A. ET OLSZANOWSKI, A. (2008). Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology* 99 (10): 4285-4291.
- KÄPPELI, O., ET FINNERTY, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology* 140 (2): 707-712.
- KESPICHAYAWATTANA, W., INTACHOTE, P., UTAISINCHAROEN, P. ET SIRISINHA, S. (2004). Virulent *Burkholderia* pseudomallei is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured human epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 36 (5): 287-292.
- KHARAZMI, A., BIBI, Z., NIELSEN, H., HØIBY, N. ET DÖRING, G. (1989). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 97 (7-12): 1068-1072.
- KIM, H.-S., YOON, B.-D., LEE, C.-H., SUH, H.-H., OH, H.-M., KATSURAGI, T. ET TANI, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (1): 41-46.
- KIM, H. S., SCHELL, M., YU, Y., ULRICH, R., SARRIA, S., NIERMAN, W. ET DESHAZER, D. (2005). Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics* 6 (1): 174.
- KIRATISIN, P., ET SANMEE, S. (2008). Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR *quorum* sensing system determinants. *Journal of Bacteriology* 190 (21): 7291-7297.
- KIRATISIN, P., TUCKER, K. D. ET PASSADOR, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas* aeruginosa virulence genes, functions as a multimer. *Journal of Bacteriology* 184 (17): 4912-4919.

- KNICKERBOCKER, C., NORDSTROM, D. K. ET SOUTHAM, G. (2000). The role of "blebbing" in overcoming the hydrophobic barrier during biooxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Geology* 169 (3-4): 425-433.
- KOCH, A. K., KÄPPELI, O., FIECHTER, A. ET REISER, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology* 173 (13): 4212-4219.
- KÖHLER, T., CURTY, L. K., BARJA, F., VAN DELDEN, C. ET PECHÈRE, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* 182 (21): 5990-5996.
- KOMINOS, S. D., COPELAND, C. E., GROSIAK, B. ET POSTIC, B. (1972). Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital *via* vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 24 (4): 567-570.
- KÖNIG, B., BERGMANN, U. ET KÖNIG, W. (1992). Induction of inflammatory mediator release (serotonin and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa* glycolipid. *Infection and Immunity* 60 (8): 3150-3155.
- KOOI, C., SUBSIN, B., CHEN, R., POHORELIC, B. ET SOKOL, P. A. (2006). *Burkholderia cenocepacia* ZmpB Is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infection and Immunity* 74 (7): 4083-4093.
- KOWNATZKI, R., TÜMMLER, B. ET DÖRING, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *The Lancet* 329 (8540): 1026-1027.
- KRETSCHMER, A., BOCK, H. ET WAGNER, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (4): 864-870.
- KURIOKA, S., ET LIU, P. V. (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase c activity. *Journal of Bacteriology* 93 (2): 670-674.
- LANG, S., KATSIWELA, E. ET WAGNER, F. (1989). Antimicrobial effects of biosurfactants. *Lipid / Fett* 91 (9): 363-366.
- LANG, S., ET PHILP, J. C. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74 (1-3): 59-70.
- LATIFI, A., FOGLINO, M., TANAKA, K., WILLIAMS, P. ET LAZDUNSKI, A. (1996). A hierarchical *quorum sensing* cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology* 21 (6): 1137-1146.
- LAYCOCK, M. V., HILDEBRAND, P. D., THIBAULT, P., WALTER, J. A. ET WRIGHT, J. L. C. (1991). Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (3): 483-489.
- LEELARASAMEE, A., ET BOVORNKITTI, S. (1989). Melioidosis: review and update. *Reviews of Infectious Diseases* 11 (3): 413-425.

- LÉPINE, F., DÉZIEL, E., MILOT, S. ET VILLEMUR, R. (2002). Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of Mass Spectrometry* 37 (1): 41-46.
- LEQUETTE, Y., ET GREENBERG, E. P. (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology* 187 (1): 37-44.
- LEVINSON, M. I. (2009). Surfactant production: present realities and future perspectives, in *Handbook of detergents Part F: Production*, par Zoller Uri et Sosis Paul. CRC Press Taylor & Francis Group, U.S.A.
- LEVROS, L. C., JR., DO CARMO, S., EDOUARD, E., LEGAULT, P., CHARFI, C. ET RASSART, E. (2010). Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 (9): 1062-1071.
- LEWENZA, S., CONWAY, B., GREENBERG, E. P. ET SOKOL, P. A. (1999). Quorum sensing in Burkholderia cepacia: identification of the LuxRI homologs CepRI. Journal of Bacteriology 181 (3): 748-756.
- LEWENZA, S., ET SOKOL, P. A. (2001). Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-l-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. *Journal of Bacteriology* 183 (7): 2212-2218.
- LIANG, H., LI, L., DONG, Z., SURETTE, M. G. ET DUAN, K. (2008). The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *Journal of Bacteriology* 190 (18): 6217-6227.
- LIN, S.-C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66 (2): 109-120.
- LIPUMA, J. J. (2005). Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11 (6): 528-533.
- LIPUMA, J. J. (2007). Update on *Burkholderia* nomenclature and resistance. *Clinical Microbiology Newsletter* 29 (9): 65-69.
- LU, P., ZHENG, L.-Q., SUN, J.-J., LIU, H.-M., LI, S.-P., HONG, Q. ET LI, W.-J. (2012). Burkholderia zhejiangensis sp. nov., a methyl-parathion-degrading bacterium isolated from a wastewater-treatment system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62 (Pt 6): 1337-1341.
- LUTTER, E., LEWENZA, S., DENNIS, J. J., VISSER, M. B. ET SOKOL, P. A. (2001). Distribution of *quorum sensing* genes in the *Burkholderia cepacia* complex. *Infection and Immunity* 69 (7): 4661-4666.
- MACDONALD, C. R., COOPER, D. G. ET ZAJIC, J. E. (1981). Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1): 117-123.
- MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T. A. ET GOLDBERG, J. B. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia* cepacia complex. *Nature Reviews Microbiology* 3 (2): 144-156.

- MANRESA, M. A., BASTIDA, J., MERCADÉ, M. E., ROBERT, M., DE ANDRÉS, C., ESPUNY, M. J. ET GUINEA, J. (1991). Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 8 (2): 133-136.
- MARGARITIS, A., ZAJIC, J. E. ET GERSON, D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering* 21 (7): 1151-1162.
- MARTINEZ-TOLEDO, A., RIOS-LEAL, E., VAZQUEZ-DUHALT, R., GONZALEZ-CHAVEZ MDEL, C., ESPARZA-GARCIA, J. F. ET RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. (2006). Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environmental Technology* 27 (2): 137-142.
- MATSUYAMA, T., KANEDA, K., NAKAGAWA, Y., ISA, K., HARA-HOTTA, H. ET YANO, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 174 (6): 1769-1776.
- MATSUYAMA, T., ET NAKAGAWA, Y. (1996). Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *Journal of Microbiological Methods* 25 (2): 165-175.
- MAURHOFER, M., REIMMANN, C., SCHMIDLI-SACHERER, P., HEEB, S., HAAS, D. ET DÉFAGO, G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88 (7): 678-684.
- MCCLURE, C. D., ET SCHILLER, N. L. (1992). Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 51 (2): 97-102.
- MCCLURE, C. D., ET SCHILLER, N. L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids *In Vitro* and *In Vivo. Current Microbiology* 33 (2): 109-117.
- MCKENNEY, D., BROWN, K. E. ET ALLISON, D. G. (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *Journal of Bacteriology* 177 (23): 6989-6992.
- MEHTA, S. K., SHARMA, S., MEHTA, N. ET CAMEOTRA, S. S. (2010). Biomimetic amphiphiles: properties and potential use, pp. 102-120, in *Biosurfactants*, par Sen Ramkrishna. Springer New York.
- MILLER, M. B., ET BASSLER, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology 55 (1): 165-199.
- MULLIGAN, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 14 (5): 372-378.
- MULLIGAN, C. N., ET GIBBS, B. F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (11): 3016-3019.
- MULLIGAN, C. N., ET GIBBS, B. F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings* of the Indian National Science Academy 870: 31-55.
- MURATA, Y., MAEDA, Y., KUNIYASU, H., YAMAGUCHI, T., TANAKA, M., SHIMOZAWA, R., WAKITA, H. ET TABATA, Y. (1997). Effects of temperature and chain length on the properties of long chain polyoxyethylene

- dodecyl ethers in aqueous solution pp. 70-74, in *Formation and Dynamics of Self-Organized Structures in Surfactants and Polymer Solutions*, par Kawasaki K., Lindman B. et Okabayashi H. Springer Berlin / Heidelberg.
- NADAL JIMENEZ, P., KOCH, G., THOMPSON, J. A., XAVIER, K. B., COOL, R. H. ET QUAX, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 46-65.
- NAVON-VENEZIA, S., BANIN, E., RON, E. Z. ET ROSENBERG, E. (1998). The bioemulsifier alasan: role of protein in maintaining structure and activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (4): 382-384.
- NEALSON, K. H. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. Archives of Microbiology 112 (1): 73-79.
- NETO, V. (2007). Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition de 1,3-dipolaire, Thèse à l'École Doctorale Science-Technologie-Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges, Limoges.
- NEU, T., HÄRTNER, T. ET PORALLA, K. (1990). Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic. Applied Microbiology and Biotechnology 32 (5): 518-520.
- NEU, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews* 60 (1): 151-166.
- NICHAYAPUN, P. (2005). Identification and characterization of rhamnolipid operon in *Burkholderia* pseudomallei, Mémoire de Maîtrise à Faculty of Science, Mahidol.
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O. ET CONTIERO, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress* 21 (6): 1593-1600.
- NOORDMAN, W. H., ET JANSSEN, D. B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9): 4502-4508.
- OCHSNER, U. A., FIECHTER, A. ET REISER, J. (1994A). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia* coli of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 269 (31): 19787-19795.
- OCHSNER, U. A., KOCH, A. K., FIECHTER, A. ET REISER, J. (1994B). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 176 (7): 2044-2054.
- OLIVEIRA, F. J. S., VAZQUEZ, L., DE CAMPOS, N. P. ET DE FRANÇA, F. P. (2009). Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Process Biochemistry* 44 (4): 383-389.
- ONG, C., OOI, C. H., WANG, D., CHONG, H., NG, K. C., RODRIGUES, F., LEE, M. A. ET TAN, P. (2004). Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species. *Genome Research* 14 (11): 2295-2307.

- OVERHAGE, J., LEWENZA, S., MARR, A. K. ET HANCOCK, R. E. W. (2007). Identification of genes Involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *Journal of Bacteriology* 189 (5): 2164-2169.
- OWSIANIAK, M., CHRZANOWSKI, Ł., SZULC, A., STANIEWSKI, J., OLSZANOWSKI, A., OLEJNIK-SCHMIDT, A. K. ET HEIPIEPER, H. J. (2009A). Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technology* 100 (3): 1497-1500.
- OWSIANIAK, M., SZULC, A., CHRZANOWSKI, Ł., CYPLIK, P., BOGACKI, M., OLEJNIK-SCHMIDT, A. ET HEIPIEPER, H. (2009B). Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (3): 545-553.
- PAJARRON, A. M., KOSTER, C. G., HEERMA, W., SCHMIDT, M. ET HAVERKAMP, J. (1993). Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconjugate Journal* 10 (3): 219-226.
- PAMP, S. J., ET TOLKER-NIELSEN, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189 (6): 2531-2539.
- PANDIT, N. K., ET STRYKOWSKI, J. M. (1989). Effect of pH and temperature on the solubility of a surface active carboxylic acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78 (9): 767-770.
- PARKINS, M. D., CERI, H. ET STOREY, D. G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Molecular Microbiology* 40 (5): 1215-1226.
- PARRA, J. L., GUINEA, J., MANRESA, M. A., ROBERT, M., MERCADE, M. E., COMELLES, F. ET BOSCH, M. P. (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 66 (1): 141-145.
- PARRA, J. L., PASTOR, J., COMELLES, F., MANRESA, M. A. ET BOSCH, M. P. (1990). Studies of biosurfactants obtained from olive oil. Hanser, Munich.
- PATANKAR, A. V., ET GONZÁLEZ, J. E. (2009). Orphan LuxR regulators of *quorum sensing*. FEMS Microbiology Reviews 33 (4): 739-756.
- PATEL, M. K., THEIR, A. ET WORRELL, E. (1999). Surfactant production and use in Germany: resource requirements and CO2 emissions. *Resources, conservation and recycling* 25 (1): 61-78.
- PAYNE, G. W., VANDAMME, P., MORGAN, S. H., LIPUMA, J. J., COENYE, T., WEIGHTMAN, A. J., JONES, T. H. ET MAHENTHIRALINGAM, E. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7): 3917-3927.
- PEARSON, J. P., PASSADOR, L., IGLEWSKI, B. H. ET GREENBERG, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (5): 1490-1494.

- Persson, A., Österberg, E. et Dostalek, M. (1988). Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (1): 1-4.
- PROMMACHAN, O. (2002). Production and application of biosurfactant from *Bacillus MUV4*, Mémoire de Maîtrise à Biological Science, Prince of Songkla University.
- RAHIM, R., OCHSNER, U. A., OLVERA, C., GRANINGER, M., MESSNER, P., LAM, J. S. ET SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology* 40 (3): 708-718.
- RAHMAN, A., ET BROWN, C. W. (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. M., RAHMAN, T. J., MCCLEAN, S., MARCHANT, R. ET BANAT, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress* 18 (6): 1277-1281.
- RAHMAN, P. K. S. M., ET GAKPE, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants. *Biotechnology* 7: 360-370.
- RAINA, S., DE VIZIO, D., ODELL, M., CLEMENTS, M., VANHULLE, S. ET KESHAVARZ, T. (2009). Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? Biotechnology and Applied Biochemistry 54 (2): 65-84.
- RAPP, P., BOCK, H., WRAY, V. ET WAGNER, F. (1979). Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Journal of General Microbiology* 115 (Dec): 491-503.
- RASHID, M. H., ET KORNBERG, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (9): 4885-4890.
- READ, R. C., ROBERTS, P., MUNRO, N., RUTMAN, A., HASTIE, A., SHRYOCK, T., HALL, R., MCDONALD-GIBSON, W., LUND, V., TAYLOR, G. ET ET, A. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology* 72 (6): 2271-2277.
- RECKSEIDLER, S. L., DESHAZER, D., SOKOL, P. A. ET WOODS, D. E. (2001). Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia* pseudomallei as a major virulence determinant. *Infection and Immunity* 69 (1): 34-44.
- REILING, H. E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L. H., HIRT, R., KAPPELI, O. ET FIECHTER, A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (5): 985-989.
- Research, C. (Editor), 2012. Market study: surfactants.
- RHOLL, D. A., TRUNCK, L. A. ET SCHWEIZER, H. P. (2008). In Vivo Himar1 transposon mutagenesis of Burkholderia pseudomallei. Applied and Environmental Microbiology 74 (24): 7529-7535.

- ROBERT, M., MERCADÉ, M. E., BOSCH, M. P., PARRA, J. L., ESPUNY, M. J., MANRESA, M. A. ET GUINEA, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters* 11 (12): 871-874.
- ROSEN, M. J. (1978). Surfactants and interfacial phenomena. Wiley, New York.
- ROSENBERG, E., ET RON, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology 52 (2): 154-162.
- ROSENBERG, E., ZUCKERBERG, A., RUBINOVITZ, C. ET GUTNICK, D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Applied and Environmental Microbiology* 37 (3): 402-408.
- ROTZ, L. D., KHAN, A. S., LILLIBRIDGE, S. R., OSTROFF, S. M. ET HUGHES, J. M. (2002). Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerging Infectious Diseases* 8 (2): 225-230.
- SALAGER, J.-L. (2002). Surfactants: types and uses, Universidad de los Andes, Facultad de Ingenieria, Escuela de Ingeniera Quimica, Mérida Venezuela. accessible depuis: http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf.
- SCHUSTER, M., ET GREENBERG, E. P. (2008). LuxR-Type proteins in *P. aeruginosa quorum sensing*: Distinct mechanisms with global implications, pp. 133-144, in *Chemical Communication among bacteria*, par Winans Stephen C. et Bassler Bonnie L. American Society for Microbiology.
- SCHUSTER, M., ET PETER GREENBERG, E. (2006). A network of networks: quorum sensing gene regulation in Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Medical Microbiology 296 (2–3): 73-81.
- SCHWEIZER, H. P., ET CHUANCHUEN, R. (2001). Small broad-host-range lacZ operon fusion vector with low background activity. *Biotechniques* 31 (6): 1258,1260.
- SEYDLOVA, G., ET SVOBODOVA, J. (2008). Development of membrane lipids in the surfactin producer *Bacillus* subtilis. Folia Microbiologica (Praha) 53 (4): 303-307.
- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G. N., Gross, E., James, E. K., Sprent, J. I., Young, J. P. W. Et Chen, W.-M. (2012). *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. native to north-east Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (Pt 9): 2272-2278.
- SHROUT, J. D., CHOPP, D. L., JUST, C. L., HENTZER, M., GIVSKOV, M. ET PARSEK, M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* 62 (5): 1264-1277.
- SIERRA, G. (1960). Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 26 (1): 189-192.
- SIM, L., WARD, O. P. ET LI, Z. Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated from Pseudomonas aeruginosa UW-1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19 (4): 232-238.

- SIM, S. H., YU, Y., LIN, C. H., KARUTURI, R. K., WUTHIEKANUN, V., TUANYOK, A., CHUA, H. H., ONG, C., PARAMALINGAM, S. S., TAN, G., TANG, L., LAU, G., OOI, E. E., WOODS, D., FEIL, E., PEACOCK, S. J. ET TAN, P. (2008). The core and accessory genomes of *Burkholderia pseudomallei*: implications for human melioidosis. *PLoS Pathogens* 4 (10): e1000178.
- SIMON, R., PRIEFER, U. ET PUHLER, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechnology* 1 (9): 784-791.
- SINGH, M., ET DESAI, J. D. (1989). Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Indian journal of experimental biology* 27 (3): 224-226.
- SMALL, D. M. (1970). Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. *Federation proceedings* 29 (4): 1320-1326.
- SOBERON-CHAVEZ, G. (2011). Biosurfactants: from genes to applications. Springer Berlin, Heidelberg.
- SOKOL, P. A., SAJAN, U., VISSER, M. B., GINGUES, S., FORSTNER, J. ET KOOI, C. (2003). The CepIR *quorum sensing* system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 149 (12): 3649-3658.
- SONG, Y., XIE, C., ONG, Y.-M., GAN, Y.-H. ET CHUA, K.-L. (2005). The BpsIR quorum sensing system of Burkholderia pseudomallei. Journal of Bacteriology 187 (2): 785-790.
- SOTIROVA, A., SPASOVA, D., GALABOVA, D., KARPENKO, E. ET SHULGA, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Current Microbiology* 56 (6): 639-644.
- SPEIGHT, J. G., ET LANGE, N. A. (2005). Lange's handbook of chemistry, pp. 1661-1665, 10th, édité. McGraw-Hill.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J., BRINKMAN, F. S. L., HUFNAGLE, W. O., KOWALIK, D. J., LAGROU, M., GARBER, R. L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L. L., COULTER, S. N., FOLGER, K. R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G. K. S., WU, Z., PAULSEN, I. T., REIZER, J., SAIER, M. H., HANCOCK, R. E. W., LORY, S. ET OLSON, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (6799): 959-964.
- STOYANOVA, M., PAVLINA, I., MONCHEVA, P. ET BOGATZEVSKA, N. (2007). Biodiversity and incidence of Burkholderia species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 31 (3): 306-310.
- STUTTS, M. J., SCHWAB, J. H., CHEN, M. G., KNOWLES, M. R. ET BOUCHER, R. C. (1986). Effects of *Pseudomonas* aeruginosa on bronchial epithelial ion transport. *The american review of respiratory disease* 134 (1): 17-21.
- SUGIHARA, G., YAMAKAWA, K., MURATA, Y. ET TANAKA, M. (1982). Effects of pH, pNa, and temperature on micelle formation and solubilization of cholesterol in aqueous solutions of bile salts. *The Journal of Physical Chemistry* 86 (14): 2784-2788.

- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. ET KUMAR, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731-2739.
- THANBICHLER, M., ET SHAPIRO, L. (2006). Chromosome organization and segregation in bacteria. *Journal of Structural Biology* 156 (2): 292-303.
- TOKIWA, F., ET OHKI, K. (1968). The effect of temperature on the surface potentials of surfactant micelles. *Colloid and Polymer Science* 223 (2): 135-138.
- TREMBLAY, J., RICHARDSON, A.-P., LÉPINE, F. ET DÉZIEL, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology* 9 (10): 2622-2630.
- TULEVA, B. K., IVANOV, G. R. ET CHRISTOVA, N. E. (2002). Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 57 (3-4): 356-360.
- ULRICH, R. L., DESHAZER, D., BRUEGGEMANN, E. E., HINES, H. B., OYSTON, P. C. ET JEDDELOH, J. A. (2004A). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Medical Microbiology* 53 (11): 1053-1064.
- ULRICH, R. L., DESHAZER, D., HINES, H. B. ET JEDDELOH, J. A. (2004B). Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infection and Immunity* 72 (11): 6589-6596.
- ULRICH, R. L., HINES, H. B., PARTHASARATHY, N. ET JEDDELOH, J. A. (2004c). Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 *quorum sensing* network. *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4350-4360.
- VAN BOGAERT, I. N., SAERENS, K., DE MUYNCK, C., DEVELTER, D., SOETAERT, W. ET VANDAMME, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. Applied Microbiology and Biotechnology 76 (1): 23-34.
- VAN DELDEN, C., ET IGLEWSKI, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases* 4 (4): 551-560.
- VAN GENNIP, M., CHRISTENSEN, L. D., ALHEDE, M., PHIPPS, R., JENSEN, P. Ø., CHRISTOPHERSEN, L., PAMP, S. J., MOSER, C., MIKKELSEN, P. J., KOH, A. Y., TOLKER-NIELSEN, T. I. M., PIER, G. B., HØIBY, N., GIVSKOV, M. ET BJARNSHOLT, T. (2009). Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 117 (7): 537-546.
- VANDAMME, P., HENRY, D., COENYE, T., NZULA, S., VANCANNEYT, M., LIPUMA, J. J., SPEERT, D. P., GOVAN, J. R. W. ET MAHENTHIRALINGAM, E. (2002). Burkholderia anthina sp. nov. and Burkholderia pyrrocinia, two additional Burkholderia cepacia complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. FEMS Immunology and Medical Microbiology 33 (2): 143-149.

- VANDAMME, P., HOLMES, B., COENYE, T., GORIS, J., MAHENTHIRALINGAM, E., LIPUMA, J. J. ET GOVAN, J. R. W. (2003). Burkholderia cenocepacia sp. nov.—a new twist to an old story. Research in Microbiology 154 (2): 91-96.
- VANDAMME, P., HOLMES, B., VANCANNEYT, M., COENYE, T., HOSTE, B., COOPMAN, R., REVETS, H., LAUWERS, S., GILLIS, M., KERSTERS, K. ET GOVAN, J. R. W. (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (4): 1188-1200.
- VANDEPUTTE, J. (2009). Agro-tensioactifs, édité par Industries & Agro-Ressources.
- VANLAERE, E., BALDWIN, A., GEVERS, D., HENRY, D., DE BRANDT, E., LIPUMA, J. J., MAHENTHIRALINGAM, E., SPEERT, D. P., DOWSON, C. ET VANDAMME, P. (2009). Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (1): 102-111.
- VANLAERE, E., LIPUMA, J. J., BALDWIN, A., HENRY, D., DE BRANDT, E., MAHENTHIRALINGAM, E., SPEERT, D., DOWSON, C. ET VANDAMME, P. (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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 (7): 1580-1590.
- VASILEVA-TONKOVA, E., GALABOVA, D., STOIMENOVA, E. ET LALCHEV, Z. (2006). Production and properties of biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 61 (7-8): 553-559.
- VATER, J., KABLITZ, B., WILDE, C., FRANKE, P., MEHTA, N. ET CAMEOTRA, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (12): 6210-6219.
- VENKATA RAMANA, K., ET KARANTH, N. G. (1989). Factors affecting biosurfactant production using Pseudomonas aeruginosa CFTR-6 under submerged conditions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 45 (4): 249-257.
- VENTURI, V., FRISCINA, A., BERTANI, I., DEVESCOVI, G. ET AGUILAR, C. (2004). Quorum sensing in the Burkholderia cepacia complex. Research in Microbiology 155 (4): 238-244.
- VERMIS, K., COENYE, T., LIPUMA, J. J., MAHENTHIRALINGAM, E., NELIS, H. J. ET VANDAMME, P. (2004). Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (3): 689-691.
- VERSTRAETEN, N., BRAEKEN, K., DEBKUMARI, B., FAUVART, M., FRANSAER, J., VERMANT, J. ET MICHIELS, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* 16 (10): 496-506.
- VIAL, L., CHAPALAIN, A., GROLEAU, M.-C. ET DÉZIEL, E. (2011). The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environmental Microbiology* 13 (1): 1-12.

- VIAL, L., LÉPINE, F., MILOT, S., GROLEAU, M.-C., DEKIMPE, V., WOODS, D. E. ET DÉZIEL, E. (2008). Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum sensing regulation. Journal of Bacteriology 190 (15): 5339-5352.
- WARD, M. (1996). Surfactant sector feels the strain of a buyer's market. *European Chemical News* 6: 12-14.
- WHITMORE, A. (1913). An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *Journal of hygiene* (London) 13 (1): 1-34 31.
- WINSLOW, C.-E. A., BROADHURST, J., BUCHANAN, R. E., KRUMWIEDE, C., ROGERS, L. A. ET SMITH, G. H. (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. *Journal of Bacteriology* 5 (3): 191-229.
- WINSOR, G. L., KHAIRA, B., VAN ROSSUM, T., LO, R., WHITESIDE, M. D. ET BRINKMAN, F. S. L. (2008). The *Burkholderia* Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses. *Bioinformatics* 24 (23): 2803-2804.
- WINSOR, G. L., LAM, D. K. W., FLEMING, L., LO, R., WHITESIDE, M. D., YU, N. Y., HANCOCK, R. E. W. ET BRINKMAN, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Research* 39 (suppl 1): D596-D600.
- WOODCOCK, D. M., CROWTHER, P. J., DOHERTY, J., JEFFERSON, S., DECRUZ, E., NOYER-WEIDNER, M., SMITH, S. S., MICHAEL, M. Z. ET GRAHAM, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* 17 (9): 3469-3478.
- 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; discussion 484-485.
- XAVIER, J. B., KIM, W. ET FOSTER, K. R. (2011). A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 79 (1): 166-179.
- XIAO, G., HE, J. ET RAHME, L. G. (2006). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex *quorum sensing* circuitry. *Microbiology* 152 (6): 1679-1686.
- YABUUCHI, E., KAWAGUCHI, Y., EZAKI, T., IKEDO, M., DEJSIRILERT, S., FUJIWARA, N., NAKA, T. ET KOBAYASHI, K. (2000).

  Burkholderia uboniae sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from Burkholderia thailandensis and Burkholderia vietnamiensis. Wiley-Blackwell, Tokyo.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T. ET ARAKAWA, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology* 36 (12): 1251-1275.

- YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N., WRAY, V. ET FREDRICKSON, H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5): 1706-1713.
- YANG, M., GIEL, J. L., CAI, T., ZHONG, Z. ET ZHU, J. (2009). The LuxR family *quorum sensing* activator MrtR requires its cognate autoinducer for dimerization and activation but not for protein folding. *Journal of Bacteriology* 191 (1): 434-438.
- YEUNG, A. T. Y., TORFS, E. C. W., JAMSHIDI, F., BAINS, M., WIEGAND, I., HANCOCK, R. E. W. ET OVERHAGE, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of Bacteriology* 191 (18): 5592-5602.
- Yu, Y., Kim, H. S., Chua, H., Lin, C., Sim, S., Lin, D., Derr, A., Engels, R., Deshazer, D., Birren, B., Nierman, W. et Tan, P. (2006). Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. *BMC Microbiology* 6 (1): 46.
- ZHANG, L., SOMASUNDARAN, P., SINGH, S. K., FELSE, A. P. ET GROSS, R. (2004). Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 240 (1–3): 75-82.
- ZHANG, X., ET BREMER, H. (1995). Control of the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter strength by ppGpp. *Journal of Biological Chemistry* 270 (19): 11181-11189.
- ZHANG, Y., ET MILLER, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* 58 (10): 3276-3282.
- ZHU, K., ET ROCK, C. O. (2008). RhIA converts β-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology* 190 (9): 3147-3154.
- ZHU, L., YANG, X., XUE, C., CHEN, Y., QU, L. ET LU, W. (2012). Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. *Bioresource Technology* 117 (0): 208-213.
- ZUKER, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406-3415.
- ZULIANELLO, L., CANARD, C., KÖHLER, T., CAILLE, D., LACROIX, J.-S. ET MEDA, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 74 (6): 3134-3147.

## **APPENDICE A:** Solutions

Sauf indication contraire, les solutions sont conservées à 4°C.

## **Tampon Z**, pH = 7,0

Produit	Quantité (pour 1L)	Molarité (M)
Na₂HPO₄	8,52 g	0,06
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	5,5 g	0,04
KCl	0,75 g	0,01
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,246 g	0,001
β-mercaptoéthanol	2,7 mL	0,05

## Tampon phosphate salin pour l'ONPG, pH = 7,0

Produit	Quantité (pour 1L)	Molarité (M)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 g	0,06	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	5,5 g	0,04	

#### **ONPG**

Produit	Quantité (pour 50 mL)	Molarité (M)	
Tampon phosphate salin	50 mL	1	
ONPG	0,2 g	0,067	

L'ONPG est conservé à -20°C

## **TBE (10X)**, pH = 8,0

Produit	Quantité (pour 500 mL)	Molarité (M)	
Tris	56 g	0,46	
Acide borique	27,5 g	0,44	
EDTA (0,5 M)	20 mL	0,0125	

## Tampon de conservation des protéines (2X)

Produit	Concentration finale
HEPES, pH 8,0	0,04 M
EDTA	0,001 M
Glycérol	40 % (v/v)

## Tampon B&W (2X), pH = 7.5

Produit	Quantité (pour 11 mL)	Molarité (M)	
TrisHCl (100 mM), pH 7,5	1,1 mL	0,01	
EDTA (500 mM)	22 μL	0,001	
NaCl (5M)	4,4 mL	2	

## Tampon de ligation (10X)

Produit	Quantité (pour 20 mL)	Molarité (M)
HEPES (1 M), pH 7,5	4 mL	0,2
KCI (1 M)	6 mL	0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,5 M)	4 mL	0,1
DTT	11,568 mg	0,01

Ce tampon devrait contenir également de l'EDTA (10 mM) et du Tween 20 (2% w/v) mais les échantillons protéiques, dans les conditions de l'expérience présentées dans ce mémoire, étaient déjà concentrés en EDTA et en glycérol, d'où le choix de ne pas en rajouter dans le tampon de ligation.

#### Tampon d'hybridation (1X)

Produit	Quantité (pour 1 mL)
Tampon de ligation (10X)	487,8 μL
BSA (100X)	24,4 μL
PolydidC (1 mg.mL <sup>-1</sup> )	487,8 μL

#### Tampon de lavage faible en sel (1X)

Produit	Quantité (pour 100 mL)	Concentration finale
TrisHCl (100 mM), pH 8,0	20 mL	0,02 M
Triton (10 % v/v)	50 μL	0,005 % (v/v)
EDTA (500 mM)	200 μL	0,001 M
KCI (1 M)	7,5 mL	0,075 M

#### Gel d'électrophorèse 12%

Produit	Running gel (12%)	Stacking gel (4%)
Eau distillée	21,75 mL	19,05 mL
40% acrylamide/bisacrylamide (37,5:1)	15 mL	2,5 mL
TrisHCl (1,5 M) pH 8,8	12,5 mL	-
TrisHCl (1 M) pH 6,8	3.	3,15 mL
SDS 10% (w/v)	500 μL	250 μL
TEMED	25 μL	25 μL
APS 10%	250 μL	125 μL
Total	50 mL	25 mL

## **APPENDICE B**: Amorces, réactifs et programmes pour PCR

## Amorces utilisées dans ces travaux

Nom	Séquence (5'-3')	Tm	Longueur (pb)
Thai-UpOp1-F	G <u>GAATTC</u> CCCGAAGGATATCGGTTTTT	58	27
UpOpl.541-Bt	<u>AGGCCT</u> GTTAATGCGGGAAGGGTTTT	58	26
UpOpl.353-Bt	<u>AGGCCT</u> TTCAAGAGGCGTCATGAGAG	60	26
Thai-UpOp2-F	CCG <u>GAATTC</u> CGCATTCACCACAATGGA	54	27
Thai-UpOp-R	CG <u>GGATCC</u> GTTCACGAGGATGACCGTCT	62	28
pRhIA1-Bthai	CCCGAAGGATATCGGTTTTT	58	20
pRhIA2-Bthai	CGCATTCACCACAATGGA	54	18
pRhIAR-Bthai	GTTCACGAGGATGACCGTCT	62	20
pRhIAR-Bthai.biot	<b>'G</b> TTCACGAGGATGACCGTCT	62	20
Bt-rhIA5'RACE-GSP1	TCACGTAATCCGTCATC	50	17
Bt-rhIA5'RACE-GSP2	CAGAATCTCCACCTCGTCGT	62	20
Bthai_ronde1_2	CCGAGATAGGGTTGAGTGTTG	64	21
Tn-pHBurk1-Top	GCATTTAATACTAGCGACGCC	62	21
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGAG	67	34
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNACGCC	73	35
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNNGATAT	67	35
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	62	20

(X : Site enzyme de restriction; 'X : oligo biotinylé)

## > PCR classique

## Réactifs (Enzyme et tampon Feldan) :

Réactif	Volume (μL)
H₂O mQ stérile	19,25
Tampon PCR (10X)	2,5
DMSO	1
dNTP (10 mM)	0,5
Amorce sens (10 μM)	0,5
Amorce antisens (10 µM)	0,5
Matrice (ADN à 100 ng.μL <sup>-1</sup> )	0,5
Polymérase Taq (0,5 U.μL <sup>-1</sup> )	0,25

Total 25

## Programme:

Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (min : seconde)
1X	95	2:00
35X	95	0:30
	55	0:40
100	72	1:00
1X	72	7:00
1X	4	00

## > PCR de vérification d'absence d'ADN dans les extractions d'ARN

## Réactifs (Enzyme et tampon NEB) :

Réactif	Volume (μL)
H₂O mQ stérile	7,5
Tampon PCR (10X)	2,5
DMSO	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
pRhlA1-Bthai (10 μM)	0,5
pRhlAR-Bthai (10 μM)	0,5
Matrice (extraction ARN)	10 (dilution 3 μL ARN
	dans 27 μL H₂O DEPC)
Polymérase Taq (0,5 U.μL <sup>-1</sup> )	1

Total 25

## Programme:

Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (min : seconde)
1X	95	5:00
40X	95	0:30
	55	0:30
	72	1:30
1X	72	10:00
1X	4	00

## > PCR du 5'RACE (cf. Figure 14 p. 68)

## Réactifs de l'étape 6, PCR sur l'ADNc simple brin de rhlA:

Volume (μL)
16,5
5
3
1
2
2
20
0,5

Total 50

## Programme de l'étape 6 :

Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (min : seconde)
1X	94	2:00
35X	94	0:30
	55	0:30
	72	1:00
1X	72	7:00
1X	5	00

## Réactifs de l'étape 7, seconde PCR sur les produits de l'étape 6 :

Réactif	Volume (μL)
H <sub>2</sub> O DEPC	33,5
Tampon PCR (10X)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3
dNTP (10 mM)	1
pRhIAR-Bthai (10 μM)	1
AUAP (10 μM)	1
Matrice (ADN)	20 (dilution 5 µL produit PCR de
	l'étape 6 dans 495 µL tampon TE)
Polymérase Taq (0,5 U.μL <sup>-1</sup> )	0,5

Total 50

## Programme de l'étape 7 :

Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (min : seconde)
1X	94	2:00
35X	94	0:20
	55	0:30
	72	0:30
1X	72	5:00
1X	4	00

## > PCR double ronde et traitement à l'ExoSAP-IT

## Réactifs 1ère ronde :

Réactif	Volume (μL) pour 1 réaction	
H₂O mQ stérile	2,8	
Tampon PCR (10X)	1	
dNTP (10 mM)	0,2	
Bthai_ronde1_2 (10 µM)	0,5	
CEKG2A (10 μM)	2	
CEKG2B (10 μM)	1	
CEKG2C (10 μM)	1	
Matrice (ADN à 100 ng.μL <sup>-1</sup> )	0,5	
Polymérase Taq (0,5 U.µL <sup>-1</sup> )	1	

Total 10

## Programme 1ère ronde :

Température (°C)	Temps (min : seconde)
95	2:00
95	0:30
30	0:30
72	1:30
95	0:30
45	0:30
72	2:00
72	5:00
4	∞
	95 95 30 72 95 45 72

## Réactifs 2ème ronde

Réactif	Volume (µL) pour 1 réaction
H₂O mQ stérile	9,5
Tampon PCR (10X)	5
dNTP (10 mM)	1
Tn-pHBurk1-Top (10 μM)	2,5
CEKG4 (10 μM)	20
Produit PCR 1 <sup>ère</sup> ronde	10
Polymérase Taq (0,5 U.μL <sup>-1</sup> )	2

Total 50

## Programme 2<sup>ème</sup> ronde :

Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (min : seconde)
1X	95	1:00
30X	95	0:30
	52	0:30
	72	2:00
1X	72	5:00
1X	4	00

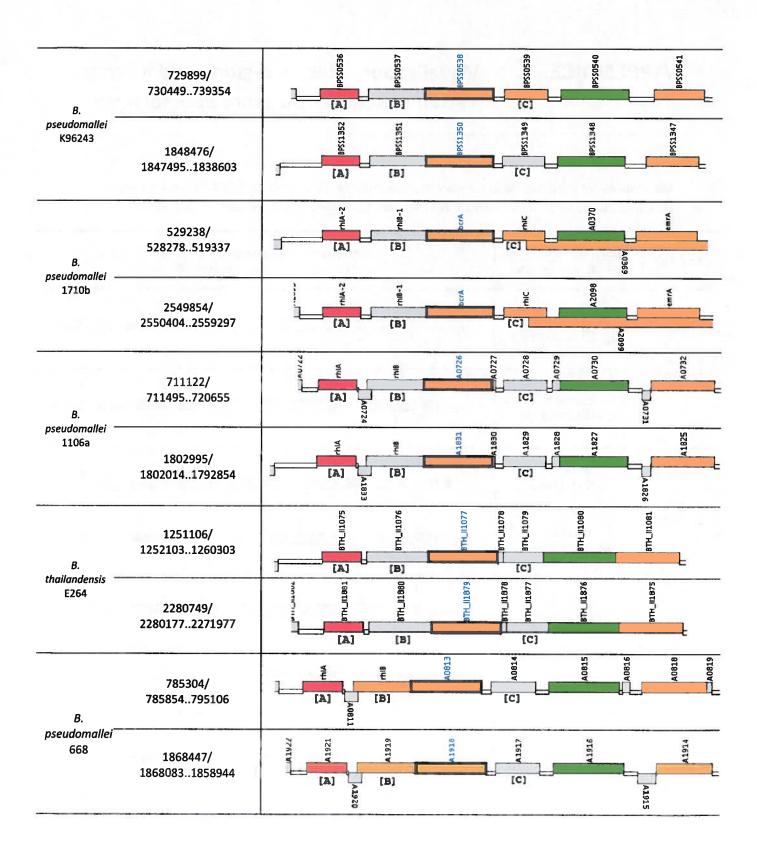
## Traitement à l'ExoSAP-IT :

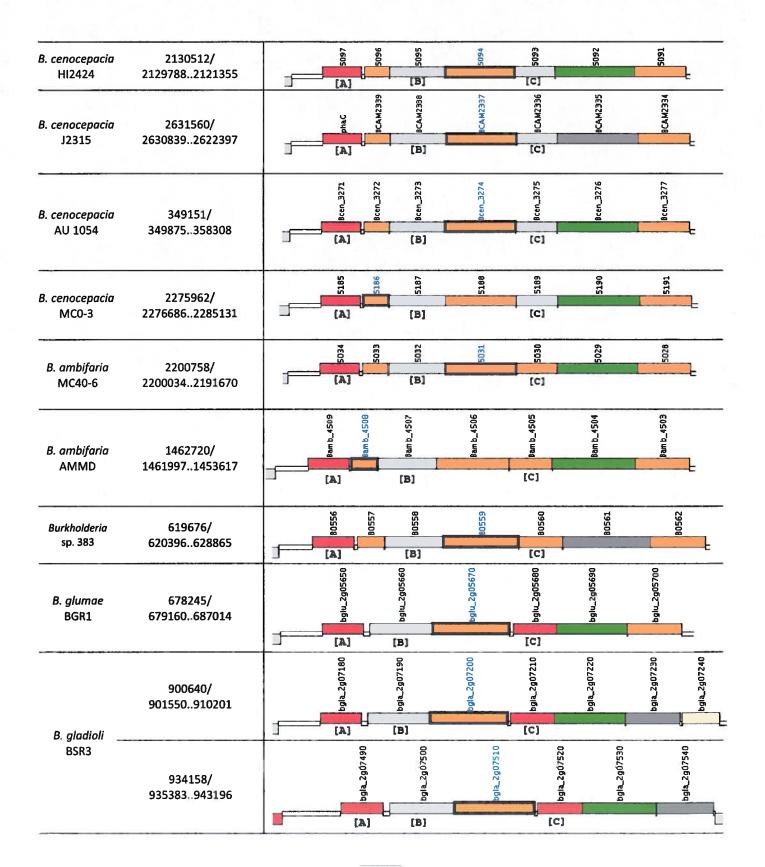
Réactifs	Volume (μL)
Produit PCR 2 <sup>ème</sup> ronde	10
ExoSAP-IT	4,5

# **APPENDICE C:** Visualisation des « régions *rhl* » chez certaines souches du genre *Burkholderia*

Les données ont été prises sur le site www.burkholderia.com (Winsor *et al.*, 2008). Toutes les « régions *rhl* » sont situées sur le Chromosome II des bactéries. Les cadres de lectures sont des prédictions.

Souche	Début région promotrice/ DébutFin région rhl		ı			ontexte génor rhlA; [B] = rhlB;		
B. mallei	1386395/ 13861661377288	u	A1422	₹ (B)	A1420	(C) A1419	A1417	A1416
NCTC 10247	1925087/ 19244741915596	06674	THIN-1	[B]	A1992	[3] rhic	A1988	A1987
B. mallei	168897/ 169063178010	ı.	#IA-2	#-5 #-5 [B]	0186	[C]	0191	0192
NCTC 10229	1067305/ 10667551057808	7701	This -1	[B]	1018	[C]	1014	1013
B. mallei	472612/ 472382463528	u	2-VIII	 € [B]	0460	[c]	0457	0456
SAVP1	736610/ 736174727320		[A] 0723	[B]	0721	CC]	0718	0717
B. mallei	461052/ 461331470248	ŗ	[A]	[8]	8MAA0461	(c)	BMAA0463	BMAA0464
ATCC 23344	936221/ 936388945305		# rhiA-2	#B-5	BMAA0922	O BMAA0923	BMAA0924	BMAA0925

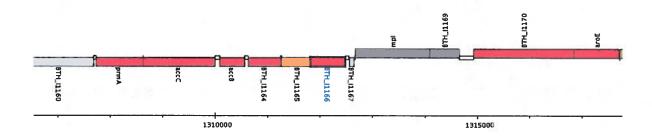




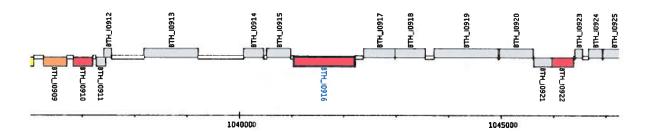
## **APPENDICE D :** Contexte génomique de l'insertion des transposons

Les données ont été prises sur le site burkholderia.com (Winsor *et al.*, 2008). Les gènes inactivés ou les régions affectées sont indiqués par un cadre en trait épais.

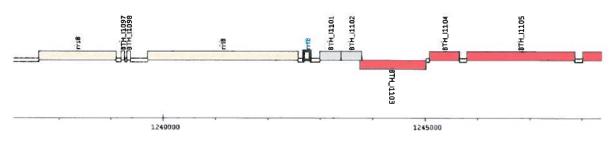
#### ❖ Mutant I-12



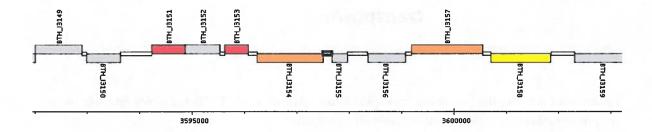
Mutant I-14 (ce mutant possède plusieurs correspondances : tous les gènes codant pour la transposase ISBma1. N'est présenté ici que la première correspondance du Tableau 17, p.118)



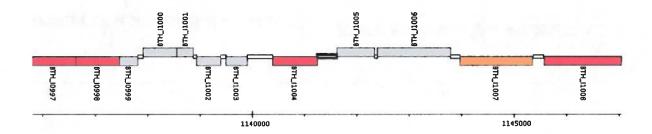
Mutant I-16 (ce mutant possède plusieurs correspondances : tous les gènes codant pour l'ARN ribosomal 5S. N'est présenté ici que la première correspondance du Tableau 18, p.120)



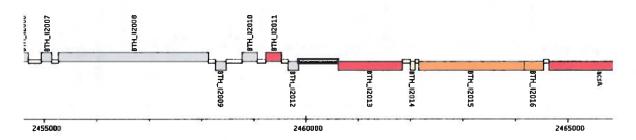
## Mutant I-22



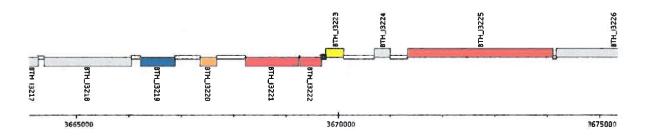
## ❖ Mutant I-29



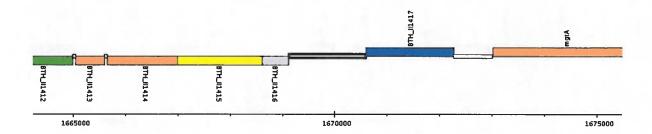
## ❖ Mutant I-95



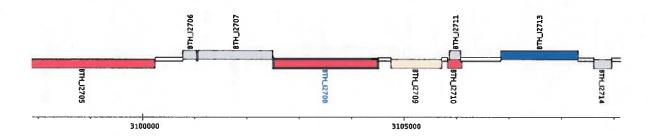
## ❖ Mutant I-96



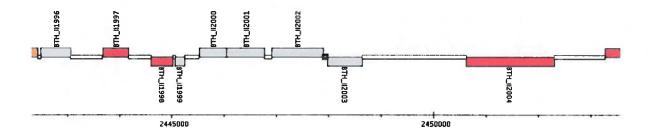
## ❖ Mutant II-3



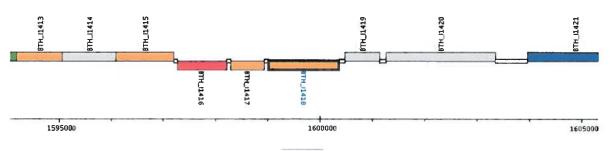
## ❖ Mutant II-9



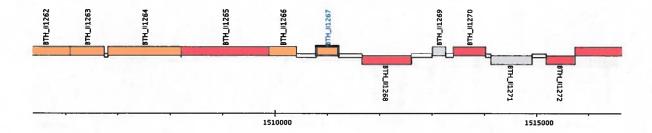
## ❖ Mutant II-16



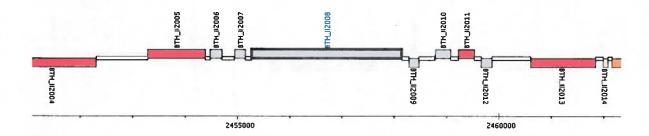
## Mutant II-20



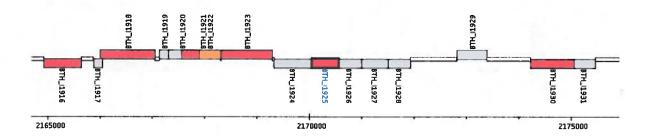
## ❖ Mutant II-28



## ❖ Mutant II-34



## ❖ Mutant II-36



## ❖ Mutant II-37

