

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Clonage, expression, purification et caractérisation fonctionnelle
de RhlA chez *Pseudomonas aeruginosa*

par

Anne-Pascale Richardson

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Doctorat en Philosophie de biologie (Ph.D.)

Jury d'évaluation

Président de jury	Réjean Beaudet (INRS-Institut Armand-Frappier)
Examineur externe	Mario Jacques (Université de Montréal)
Examineur externe	Roger C. Levesques (Université Laval)
Directeur de recherche	François Lépine (INRS-Institut Armand-Frappier)

Résumé

Les rhamnolipides sont des biosurfactants extracellulaires de type glycolipidique, synthétisés par les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ils ont été très largement étudiés depuis leur découverte par Jarvis et Johnson en 1949. Ils sont essentiels au maintien de l'architecture des biofilms, en plus d'augmenter l'hydrophobicité cellulaire. Cependant de récentes études ont démontré que *P. aeruginosa* synthétisait une nouvelle classe de biosurfactants, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïques (HAAs ou dilipides), précurseurs des rhamnolipides.

Les HAAs présentent des propriétés biosurfactantes intéressantes en abaissant plus la tension de surface que les rhamnolipides à des concentrations identiques. De plus, les HAAs moussent beaucoup moins que les rhamnolipides ce qui leur confère un avantage considérable pour de multiples applications industrielles. Les HAAs se sont aussi révélés être des agents « mouillants » extracellulaires qui contribuent à certains types de mobilité cellulaire bactérienne, notamment le « swarming ». Ainsi les HAAs ne semblent pas être que de simples intermédiaires dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides. Ils présentent des caractéristiques utiles pour le fonctionnement de *P. aeruginosa* ainsi que de nombreux intérêts pour l'industrie et le domaine médical.

Le gène *rhlA* de l'opéron *rhlAB* est indispensable à la production des HAAs. On a retrouvé de faibles quantités de HAAs dans le milieu d'une culture de la souche sauvage PG201, aucun dans le milieu de culture d'un mutant dérivé *rhlA* (UO299), mais de fortes concentrations dans le milieu de culture d'un mutant *rhlB* (UO287). Au début de ce projet, il était connu que *rhlA* avait un rôle déterminant dans la synthèse des HAAs, mais aucune étude n'avait encore défini sa fonction enzymatique, ni caractérisé ses propriétés physico-chimiques. C'est pourquoi ce projet porte sur le clonage, l'expression, la purification et la caractérisation fonctionnelle de *RhlA* chez *P. aeruginosa*.

Cette étude permettra d'améliorer les connaissances sur la voie de biosynthèse des rhamnolipides mais aussi éventuellement de développer une technique de production des HAAs, qui sont des surfactants biodégradables, pour des fins de bioremédiation ou pour d'autres applications industrielles.

Les expériences destinées à caractériser la fonction enzymatique de RhIA seront présentées, depuis la construction du vecteur d'expression pUCP18 et son clonage dans *E. coli* et la souche UO299, en passant par les étapes de purification via une colonne de nickel, jusqu'aux tests enzymatiques préliminaires qui indiquaient que les 3-hydroxyacyl-CoA seraient des substrats potentiels de RhIA pour la production de dilipides.

Étudiante

Directeur de recherche

à mes parents

*“some men see things as they are and say why.
I dream of things that never were and say why not”*
R.F. Kennedy

Remerciements

Je tiens à remercier François Lépine, mon directeur de recherche, de m'avoir accepté et accueillie dans son laboratoire en tant que candidate au doctorat. Je lui suis reconnaissante de la confiance et du soutien financier qu'il m'a accordé pour réaliser ce projet. Je le remercie aussi de m'avoir initiée au monde de la spectrométrie de masse tant par son expertise que par son enthousiasme, sans oublier les réunions chez Merck Frosst. Je le remercie de m'avoir permis de donner une autre dimension à mon projet.

Je voudrais aussi remercier Éric Déziel, qui m'a permis de réaliser la majorité de mes travaux dans son laboratoire et qui m'a considérée comme un des membres de son équipe de recherche. J'ai grandement apprécié ses nombreuses idées et ses précieux conseils, ainsi que son dynamisme et son positivisme à toute épreuve.

Je tiens particulièrement à remercier Sylvain Milot qui m'a offert son soutien technique mais aussi moral tout au long de ces cinq années. Je le remercie pour son assistance, son ingéniosité et sa bonne humeur ainsi que pour les nombreuses discussions enrichissantes tant au point de vue scientifique que personnel.

Je remercie tous les membres du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement de l'Institut Armand-Frappier que j'ai côtoyé au cours de ces cinq dernières années. Ce fut très enrichissant et stimulant de collaborer et d'échanger avec des chercheurs et des étudiants-chercheurs aux expertises aussi nombreuses que variées. Je n'oublierai pas ce cadre de travail exceptionnel, l'ambiance conviviale, les échanges de cadeaux, ainsi que toutes les autres activités scientifiques et para-académiques que nous avons réalisées ensemble.

Je tiens à adresser un grand merci à mes amis et mes collègues de l'Institut et du Musée qui m'ont supportée dans tous les sens du terme pendant ces cinq années et qui ont d'une certaine manière complété le cocon familial qui me manquait en arrivant au Québec. Je les remercie de m'avoir épaulée, écoutée et supportée moralement, techniquement et aussi parfois financièrement. Je n'oublierai pas.

Enfin, j'adresse toute ma gratitude à mes parents, dont la valeur de leur contribution dans ce projet n'est pas mesurable. Je leur suis à jamais reconnaissante de m'avoir soutenu à tous les niveaux et ainsi de m'avoir permis de réaliser un rêve que peu ont cru possible.

Table des matières

Résumé	III
Remerciements	IX
Table des matières	XIII
Liste des figures	XIX
Liste des tableaux	XXIII
Les abréviations.....	XXV
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.1.1 Généralités	6
1.1.2 Une bactérie pathogène opportuniste.....	7
1.1.3 Les facteurs de virulence.....	8
1.2 Les biosurfactants.....	9
1.2.1 La famille des rhamnolipides	10
1.2.2 La famille des dilipides	15
1.3 La voie de biosynthèse des rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i>	17
1.3.1 Les gènes <i>rhlABC</i>	17
1.3.2 Le gène <i>rhlA</i>	18
1.4 Le quorum sensing	19
1.4.1 Un système de communication intercellulaire	19
1.4.2 Le quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	20
1.4.3 La régulation de la production des rhamnolipides.....	22
<u>CHAPITRE 1 - Optimisation des conditions de culture de <i>P. aeruginosa</i> pour la production des biosurfactants.....</u>	<u>25</u>
2.1. OBJECTIFS.....	26
2.2. METHODOLOGIE	28
2.2.1. Souches bactériennes utilisées dans cette étude	28
2.2.2. Le milieu minimal SW	28
2.2.3. Sources de carbone et d'azote	28
2.2.4. Variation des concentrations en phosphate et azote.....	29
2.2.5. Les courbes de production des biosurfactants	29
2.2.6. Les courbes de croissance et de pH.....	29

2.2.7. Extraction des biosurfactants	29
2.2.8. Analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse	30
2.3. RESULTATS	31
2.3.1. Variation des sources de carbone et d'azote dans le milieu SW	31
2.3.2. Milieu SW limité en phosphate et en azote	34
2.4. L'EFFET DES MODIFICATIONS DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS	37
2.4.1. L'effet des sources de carbone et d'azote	37
2.4.2. L'effet du phosphate	39
<u>CHAPITRE 2 - Propriétés physico-chimiques des dilipides</u>	41
3.1 OBJECTIFS	42
3.2 METHODOLOGIE	44
3.2.1 Hydrolyse enzymatique des rhamnolipides pour la production de dilipides	44
3.2.2 Extraction des biosurfactants	44
3.2.3 Séparation et purification des biosurfactants par chromatographie	45
3.2.3.1 Chromatographie sur couche mince	45
3.2.3.2 Chromatographie sur gel de silice	45
3.2.4 Test de tension de surface : rhamnolipides vs dilipides	46
3.2.5 Test de moussage : rhamnolipides vs dilipides	46
3.3 RESULTATS	47
3.3.1 Hydrolyse enzymatique des rhamnolipides pour la production de dilipides	47
3.3.2 Test de tension de surface : rhamnolipides vs dilipides	47
3.3.3 Test de moussage : rhamnolipides vs dilipides	48
3.4 LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES DILIPIDES	49
<u>CHAPITRE 3 - Caractérisation fonctionnelle de RhIA</u>	51
4.1 OBJECTIFS	52
4.2 METHODOLOGIE	54
4.2.1 Souches bactériennes utilisées dans cette étude	54
4.2.1 Les plasmides et les vecteurs d'expression	54
4.2.2 Manipulation de l'ADN et construction des vecteurs d'expression	54
4.2.2.1 Extraction et purification de l'ADN bactérien total	54
4.2.2.2 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ..	55

4.2.2.3	Mini-préparation de l'ADN plasmidique	56
4.2.2.4	Digestion enzymatique de l'ADN	57
4.2.2.5	Ligation	57
4.2.3	Clonages dans <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i>	57
4.2.3.1	Transformation de DH5 α par choc thermique	57
4.2.3.2	Transformation de <i>P. aeruginosa</i> par choc thermique	58
4.2.3.3	Transformation de <i>E. coli</i> par électroporation.....	58
4.2.3.4	Vérification de la présence de l'insert.....	59
4.2.4	Complémentation de la mutation chez UO299	59
4.2.4.1	Test de complémentation.....	59
4.2.4.2	Localisation cellulaire de RhlA chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
4.2.5	Production de dilipides par BL21(DE3).....	60
4.2.5.1	Surexpression de la protéine recombinante	60
4.2.5.2	Production de dilipides marqués au ¹³ C	61
4.2.6	Production de rhamnolipides par le mutant PA2871 « tesB like »	61
4.2.7	Purification de RhlA recombinante	62
4.2.7.1	Préparation de l'échantillon.....	62
4.2.7.2	Préparation de colonne de chromatographie d'affinité au nickel	62
4.2.7.3	Purification de la protéine recombinante par gradient d'imidazole.....	63
4.2.8	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	63
4.2.9	Immunobuvardage de type Western	64
4.2.10	Immunodétection et révélation par électroluminescence	64
4.2.11	Digestion tryptique en gel et extraction des peptides.....	65
4.2.11.1	Décoloration	65
4.2.11.2	Réduction et alkylation	66
4.2.11.3	Digestion tryptique	66
4.2.11.4	Extraction des peptides.....	66
4.2.12	Synthèses	67
4.2.12.1	3 β -OH-C10-ACP.....	67
4.2.12.2	3 β -OH-C10-CoA.....	67
4.2.12.3	3 β -OH-C8-CoA (racémique).....	67
4.2.13	Tests enzymatiques	68
4.2.13.1	Deux sources d'enzyme	68
4.2.13.2	Analyse des échantillons	68

4.2.14 Analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse	68
4.2.15 Analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem	69
4.3 RESULTATS	71
4.3.1 Purification de RhlA recombinante	71
4.3.1.1 pAPR1 - En conditions dénaturantes.....	71
4.3.1.2 pAPR3 - En conditions natives	72
4.3.2 Complémentation de la souche UO299	74
4.3.3 Complémentation de la souche PAO1 Δ rhlA	75
4.3.4 Localisation cellulaire de RhlA chez <i>P. aeruginosa</i>	77
4.3.5 Production de dilipides par <i>E. coli</i> BL21(DE3)	78
4.3.6 Production de dilipides en milieu minimal M9.....	80
4.3.6.1 Optimisation du milieu M9 + acétate.....	80
4.3.6.2 Production de dilipides marqués au ^{13}C	80
4.3.7 Production de rhamnolipides par le mutant PA2871 « tesB like »	82
4.3.8 Tests enzymatiques	83
4.3.9 Analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem	88
4.4 CARACTERISATION ENZYMATIQUE DE RHLA.....	96
4.4.1 La purification de RhlA	96
4.4.2 La localisation cellulaire de RhlA	97
4.4.3 Caractérisation enzymatique de RhlA	98
4.4.4 Chiralité du substrat de RhlA	101
4.4.5 Un site actif potentiel pour RhlA.....	101
<u>CHAPITRE 4 - Production de mono-rhamnolipides chez <i>E. coli</i> et les spécificités enzymatiques de RhlA.....</u>	103
5.1 OBJECTIFS.....	104
5.2 METHODOLOGIE	105
5.2.1 Souches bactériennes et plasmides	105
5.2.2 Conditions de culture	105
5.2.3 Analyses des biosurfactants par spectrométrie de masse	105
5.3 RESULTATS	106
5.4 LONGUEUR ET ARRANGEMENT DES CHAINES HYDROCARBONEES	108

CHAPITRE 5 - Propriétés physiologiques des biosurfactants	111
6.1 OBJECTIFS.....	112
6.2 METHODOLOGIE	113
6.2.1 Les souches bactériennes.....	113
6.2.2 Le milieu de culture et les conditions de croissance	113
6.2.3 Test de swarming	113
6.2.4 Diffusion des biosurfactants.....	113
6.2.5 Analyse des biosurfactants	114
6.3 RESULTATS	115
6.4 PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DES DILIPIDES ET DES RHAMNOLIPIDES	117
Discussion générale	119
Conclusions et perspectives	125
Références	129
Annexes	149

Liste des Figures

Figure 1.1. Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	8
Figure-1.2. Les principales structures des rhamnolipides synthétisés par <i>P. aeruginosa</i> .	10
Figure 1.3. Modèle de développement d'un biofilm bactérien.....	12
Figure 1.4. Structure des HAAs (acide β -hydroxyalcanoyle- β -hydroxyalcanoïque)	15
Figure 1.5. Tension de surface des rhamnolipides et des HAAs	16
Figure 1.6. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des rhamnolipides ..	17
Figure 1.7. Quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i> . Les deux systèmes <i>las</i> et <i>rhl</i>	20
Figure 1.8. Les acylhomosérines lactones chez <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 1.9. Modèle de régulation de l'opéron <i>rhlAB</i> chez <i>P. aeruginosa</i>	22
Figure 2.1 Courbes de croissance de la souche PG201 dans le milieu SW selon les sources de carbone (mannitol, éthanol, glucose, citrate et glutamate) et d'azote (glutamate) utilisées, et suivis dans le temps du pH des milieux de culture .	31
Figure 2.2. Production des dilipides et des rhamnolipides en fonction de différentes sources de carbone	32
Figure 2.3. Production des dilipides et des rhamnolipides dans le milieu SW et ses variantes	33
Figure 2.4. Courbes de croissance de la souche PG201 dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P)	34
Figure 2.5. Production des rhamnolipides dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P)	35
Figure 2.6. Suivis dans le temps du pH dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P)	36
Figure 3.1. A- Les principales activités enzymatiques de la naringinase. B- L'activité β -rhamnosidase nécessaire à l'hydrolyse des rhamnolipides pour obtenir les HAAs	42
Figure 3.2. Tension de surface des rhamnolipides et des dilipides en fonction de leurs concentrations dans l'eau)	47
Figure 3.3. Test du moussage des rhamnolipides et des dilipides	48
Figure 4.1. Nomenclature des fragmentations de série a, b, y et x induites par un gaz de collision	70
Figure 4.2. A- Gel d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante de la purification de RhlA recombinante en condition dénaturante sur une colonne d'affinité au nickel. B - Immunovubardage de type Western sur une membrane PVDF de la purification de RhlA recombinante en condition dénaturante sur une colonne d'affinité au nickel	71

Figure 4.3. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante de la purification de RhIA recombinante en condition dénaturante sur une colonne d'affinité au nickel	72
Figure 4.4. A- Électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition native de la purification de RhIA recombinante en condition native sur une colonne d'affinité au nickel. B - Immunovubardage de type Western sur une membrane PVDF de la purification de RhIA recombinante en condition native sur une colonne d'affinité au nickel	73
Figure 4.5. Production des biosurfactants par les souches PG201, UO299 et UO299(pAPR2)	74
Figure 4.6. Profils chromatographiques des surnageants de culture des souches PAO1ΔrhIA complémentées avec les vecteurs pAPR1 et pAPR2.....	76
Figure 4.7. Spectres de masse des pics chromatographique détectés par CL/SM dans le surnageant de PAO1 ΔrhIA complémentée par pAPR1 et pAPR2.....	77
Figure 4.8. Immunobuvardage de type Western des fractions cellulaires de la souche UO299(pAPR2)	78
Figure 4.9. Profils chromatographiques des surnageants de culture des souches BL21(DE3)(pUCP18) et BL21(DE3)(pAPR3) détectés par CL/MS	79
Figure 4.10. Optimisation de la concentration en acétate dans le milieu minimal M9 pour produire des dilipides en 48 h.....	80
Figure 4.11. Profils chromatographiques des dilipides C ₁₀ C ₁₀	81
Figure 4.12. Profil des dilipides produits par BL21(DE3)(pAPR3)	82
Figure 4.13. Comparaison de la production de rhamnolipides entre les souches PAO1 et PA2871	83
Figure 4.14. Suivi des dilipides C ₁₀ C ₁₀ (m/z = 357) dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) en absence et en présence du substrat C ₁₀ CoA. .	84
Figure 4.15. Suivis des dilipides C ₁₀ C ₁₀ marqués (m/z = 377) et non marqués (m/z = 357) au ¹³ C dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) en présence des différents substrats.....	84
Figure 4.16. Suivi des dilipides C ₁₀ C ₁₀ (m/z = 357) en présence du substrat C ₁₀ CoA, dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) cultivée dans un milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate doublement marqué au ¹³ C.	85
Figure 4.17. Profils chromatographiques et spectres de masse détectés par CL/SM des surnageants de culture de la souche BL21(DE3)(pAPR3) dans un milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate non marqué et doublement marqué au ¹³ C.....	86
Figure 4.18. Suivi des dilipides C ₁₀ C ₁₀ (m/z = 357) en présence de RhIA recombinante de la souche BL21(DE3)(pAPR3) purifiée et du substrat C ₁₀ CoA	87
Figure 4.19. Identification de la protéine purifiée en condition dénaturante par colonne d'affinité au nickel à partir de la souche BL21(DE3)(pAPR1)	89
Figure 4.20. Identification de la protéine purifiée en condition native par colonne d'affinité au nickel à partir de la souche BL21(DE3)(pAPR3)	89

Figure 4.21. Spectres de masse de deux ions pseudomoléculaires (m/z) observés lors des analyses protéomiques de RhlA purifiée en condition native	91
Figure 4.22. Spectres induits par collision des ions pseudomoléculaires (m/z) 526 et 59492	
Figure 4.23. Spectre de masse des fragmentations des séries y et b de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 701 séquencé et identifié comme appartenant à RhlA	93
Figure 4.24. Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 701 analysé par le logiciel Analyst.....	94
Figure 4.25. Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 594 analysé par le logiciel Analyst	94
Figure 4.26. Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 526 analysé par le logiciel Analyst.....	95
Figure 5.1. Structure des arrangements des chaînes hydrocarbonées des mono-rhamnolipides et des dilipides	104
Figure 6.1 - Effet chémorepulsif des dilipides produits par <i>E. coli</i> sur les dendrites du swarming de <i>P. aeruginosa</i>	115
Figure 6.2 -Les di-rhamnolipides (di-RLs) diffusent plus rapidement que les dilipides (HAAs).	116
Figure 6.3 -Proposition d'un modèle de mobilité swarming chez <i>P. aeruginosa</i>	118
Figure 7.1. Modèle proposé pour la voie de biosynthèse des dilipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	123

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Différentes souches autres que <i>P. aeruginosa</i> capables de produire des biosurfactants de la famille des rhamnolipides	15
Tableau 1.2. Mise en évidence que <i>rhlA</i> est impliqué dans la production des HAAs	18
Tableau 2.1. Composition des milieux de culture SW et ses variantes en sources de phosphate et d'azote.....	34
Tableau 4.1. Séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène <i>rhlA</i> et construire les vecteurs d'expression.....	55
Tableau 5.1. Suivis au cours du temps de la production des dilipides et des rhamnolipides (Rhl) ($\mu\text{g/ml}$) par les souches <i>E. coli</i> W3110 contenant différents plasmides et <i>P. aeruginosa</i> PAO1	106
Tableau 5.2. Profil de production de mono-rhamnolipides ($\mu\text{g/ml}$) par les souches <i>E. coli</i> W3110 contenant différents plasmides et <i>P. aeruginosa</i> PAO1	106
Tableau 5.3. Profil des ratios des différentes paires isomériques de monorhamnolipides et de dilipides produits par les souches <i>E. coli</i> W3110, BL21(DE3) et <i>P. aeruginosa</i> 57RP	107

Les abréviations

3-oxo-C ₁₂ -HSL	N-3-oxododécanyl-L-homosérine lactone
ACP	Acyl carrier protein, protéine transporteuse de la fonction acyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acylhomosérine lactone
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphorique
C	carbone
C ₄ -HSL	N-butanoyl-L-homosérine lactone
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CL/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CoA	Coenzyme A
D.O.	Densité optique
dNTP	Désoxyribonucléotide
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
HAAs	Acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïques
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
m/z	Rapport masse sur charge,
N	Azote
P	Phosphate
ppm	Parties par million
PQS	2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline, « Pseudomonas quinolone signal »
PSI	Pound per square inch , livre par pouce carré.
QS	Quorum sensing
Rha	Rhamnose
Rha-C ₁₀ C ₁₀	Acide L-rhamnosyl-β-hydroxydécanyl-β-hydroxydécanoïque
Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₀	Acide L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-β-hydroxydécanyl-β-hydroxy-décanoïque
RPM	Révolutions par minute
SD	Séquence Shine-Dalgarno
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TDP	Thymidine 5'-diphosphate
TE	Tris EDTA
THF	Tétrahydrofuranne

Introduction

Les surfactants sont des molécules tensioactives aux propriétés amphiphiles qui sont soit synthétisées chimiquement soit produites par une variété de microorganismes (bactéries, levures, champignons), on parle alors de biosurfactants. L'utilisation de surfactants chimiques peut avoir des conséquences négatives sur l'environnement, certains étant toxiques à doses élevées et faiblement biodégradables. Les surfactants biologiques offrent alors une alternative intéressante en présentant souvent un faible impact environnemental ainsi que des propriétés physico-chimiques comparables sinon plus avantageuses. Ils sont généralement biodégradables et non toxiques.

Leur nature et leur pouvoir tensioactif dépendent de la souche productrice mais aussi de source de carbone utilisée. Ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes, mais également des propriétés plus spécifiques telles que des propriétés antibiotiques. Compte tenu de leurs propriétés et de leur innocuité, ils sont utilisés dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie, la cosmétologie ou encore l'industrie pharmaceutique.

Parmi les différents types de biosurfactants recensés, on trouve les lipopeptides, les phospholipides, les lipides neutres, les lipopolysaccharides et les glycolipides. Parmi ces derniers, les rhamnolipides, qui sont produits par *Pseudomonas aeruginosa*, sont les plus étudiés. Cependant, Déziel *et al.* (2002) ont mis en évidence une nouvelle classe de biosurfactants produits par *P. aeruginosa*, les dilipides (i.e. les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïques) qui sont alors présentés comme les précurseurs potentiels des rhamnolipides.

D'après Ochsner, Fiechter et Reiser (1994), l'opéron *rhlAB* et le gène *rhlC* sont les principaux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. Cependant seuls *rhlB* et *rhlC* ont été caractérisés et aucun d'eux n'est responsable de la biosynthèse des dilipides qui est la première étape de la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*.

C'est grâce aux travaux de Déziel *et al.* (2003) que le rôle de *rhlA* a commencé à être éclairci. En effet en comparant et en analysant la production des biosurfactants chez des mutants de *P. aeruginosa*, ces travaux ont permis de mettre en évidence que le mutant *rhlB* n'était capable de produire que des dilipides alors que le mutant *rhlA* ne produisait aucun biosurfactant. Ainsi il a été démontré que *rhlA* joue un rôle capital dans la voie de

biosynthèse des biosurfactants de *P. aeruginosa* et notamment dans la production des dilipides. Cependant, aucune étude n'avait encore défini sa fonction enzymatique, ni caractérisé ses propriétés physico-chimiques, comme cela avait été fait pour les gènes *rhlB* et *rhlC*.

C'est la découverte d'une nouvelle classe de biosurfactants, les dilipides, combinée à l'implication d'un gène non encore caractérisé chez *P. aeruginosa* qui a motivé ce projet de recherche qui porte donc sur la caractérisation fonctionnelle de *rhlA* chez *P. aeruginosa*. L'hypothèse générale de ce projet est que les dilipides sont le produit enzymatique de RhlA et le principal objectif est de déterminer la nature du substrat de RhlA permettant la production des dilipides.

Afin de vérifier cette hypothèse, cinq volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord il y a eu l'optimisation du milieu de culture SW pour une meilleure production de biosurfactants par *P. aeruginosa*. Par la suite, les propriétés biosurfactantes des dilipides ont été déterminées et comparées à celles des rhamnolipides. Ensuite, le rôle et la caractérisation enzymatique de RhlA dans la production des dilipides ont été déterminés en plus de son substrat potentiel et de sa localisation cellulaire. Pour ce faire, une souche hétérologue d'*Escherichia coli* a été utilisée pour surexprimer et purifier une protéine recombinante de RhlA, étiquetée avec une queue poly-histidine. Finalement certains aspects de cette étude ont donné lieu à deux collaborations scientifiques qui ont permis la publication de deux articles qui sont chacun présentés dans des chapitres distincts. Le premier article concerne l'expression hétérologue de biosurfactants pour déterminer quelques spécificités enzymatiques de RhlA par rapports à la structure chimique des rhamnolipides et des dilipides. Le second article porte sur le rôle physiologique des dilipides et des rhamnolipides dans le swarming de *P. aeruginosa*.

Ce qui fait l'originalité de cette étude tient à l'utilisation de la spectrométrie de masse comme outil d'analyse à tous les niveaux : d'une part pour analyser les biosurfactants (rhamnolipides et dilipides) tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif ; d'autre part pour identifier la protéine elle-même et caractériser le site actif de RhlA, mais aussi pour analyser la synthèse et la pureté des substrats potentiels de RhlA, testés lors de cette étude.

Cette étude permettra d'améliorer les connaissances sur la voie de biosynthèse des rhamnolipides mais aussi de développer une technique de production des dilipides, comme

surfactants biodégradables à des fins de biorestauration ou pour d'autres applications industrielles. De plus, les dilipides pourraient avoir une application dans la déstabilisation ou la prévention de la formation des biofilms de *P. aeruginosa* avec les applications industrielles ou médicales qui en découlent.

Revue de littérature

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Généralités

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négative de la famille des *Pseudomonadaceae* (Brenner, Staley et Krieg, 2001 ; Winslow *et al.*, 1917). C'est une bactérie pathogène opportuniste très versatile et ubiquitaire. Son potentiel infectieux lui permet d'infecter aussi bien l'homme et les autres vertébrés que les plantes, les insectes et les nématodes (Mahajan-Miklos, Rahme et Ausubel, 2000 ; Rahme *et al.*, 2000). De manière générale, on distingue les souches cliniques des souches environnementales. Plusieurs de ces dernières souches ont la capacité de minéraliser une grande variété de molécules organiques leur conférant un réel potentiel dans des applications de biorestauration.

P. aeruginosa est un microorganisme aérobie, avec un métabolisme strictement oxydatif et non fermentaire, dont l'oxygène est l'accepteur final d'électron. C'est un chimiohétérotrophe qui utilise l'oxydation de molécules organiques réduites comme sources métaboliques d'énergie, d'hydrogène, d'électrons et de carbone (Prescott, Harley et Klein, 1995). Capable de se développer à 4°C, *P. aeruginosa* dégrade les lipides et les protéines du lait, des viandes et des œufs.

Une des particularités de *P. aeruginosa* est l'odeur caractéristique de raisin due à la production du 2-aminoacétophénone (Cox et Parker, 1979). Cette propriété a longtemps été importante dans le diagnostic rapide de la présence de *P. aeruginosa* dans des cultures ou les blessures chez les grands brûlés. Une autre de ses métabolites particuliers est un pigment bleu, la pyocyanine (Frank et de Moss, 1959 ; Cronan et Klages, 1981 ; Cox, 1986). C'est une molécule diffusible, soluble dans l'eau et fluorescente en présence de la lumière ultraviolette (Prescott, Harley et Klein, 1995). Elle présente des propriétés antibiotiques contre une variété de microorganismes, permettant à *P. aeruginosa* de bénéficier de l'élimination de ses compétiteurs (Baron et Rowe, 1981).

L'étude de ce microorganisme a permis de grandes avancées en ce qui a trait aux connaissances en matière de physiologie et biochimie microbienne (Prescott, Harley et Klein, 1995).

1.1.2 Une bactérie pathogène opportuniste

P. aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste, c'est-à-dire habituellement inoffensive. C'est un commensal naturel se trouvant à la surface de la peau ainsi que dans l'intestin de 10 à 25% des gens en bonne santé (Nicas et Iglewski, 1985) et qui ne devient virulent que lorsque le système immunitaire est affaibli ou supprimé. *P. aeruginosa* peut coloniser pratiquement toutes les muqueuses et peut envahir le sang et les tissus. Elle a été reconnue dans plusieurs études cliniques comme étant la cause de méningites, de dermatites, d'otites externes, de kératites ulcéreuses chez les utilisateurs de lentilles cornéennes, ainsi que d'endocardites chez les toxicomanes qui s'injectent des narcotiques par voie intraveineuse (Salyers et Whitt, 2002; Bodey *et al.*, 1983) Ces infections peuvent être superficielles et de courte durée mais elles peuvent aussi se changer en bactériémies pouvant causer la mort ou devenir chroniques comme dans le cas des patients souffrant de fibrose kystique (Lyczak, Cannon et Pier, 2002; Lynch, 2001 ; Rajan et Saiman, 2002).

Quatre-vingt pourcent des patients aux prises avec la fibrose kystique sont infectés par *P. aeruginosa* avant l'âge adulte (Fitzsimmons, 1993). En effet, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections pulmonaires chroniques et de décès chez les patients atteints de la fibrose kystique. Il s'agit d'une maladie génétique et héréditaire causée par une mutation autosomale récessive du gène *cftr* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). L'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* chez les individus atteints de fibrose kystique est progressive. Elle produit des exoprotéases qui activent les métalloprotéinases endogènes et contribuent ainsi à la nécrose des tissus, entraînent une détérioration des poumons et des infections (Hobden, 2002). Les patients atteints de la fibrose kystique sont généralement infectés d'abord par *Staphylococcus aureus* et par *Haemophilus influenzae*. Leur présence diminue dans le temps pour être remplacés progressivement par *P. aeruginosa* qui devient le principal agent pathogène après une dizaine d'années (Gibson, Burns et Ramsey, 2003).

Une fois implantée, cette bactérie peut persister même après divers traitements aux antibiotiques. Elle possède différents atouts lui permettant le maintien d'une infection chronique. Elle peut partiellement inhiber la réponse inflammatoire, elle adhère aux cellules épithéliales, et elle est aussi capable de s'internaliser en utilisant la protéine non-fonctionnelle CFTR et produit plusieurs facteurs de virulence (Pier, 2002).

1.1.3 Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* sont variés et peuvent être associés à la cellule ou être sécrétés dans l'espace extracellulaire (Figure 1.1). Les composantes associées à la cellule bactérienne sont le flagelle, les pili de type IV, les adhésines et les lipopolysaccharides. Les facteurs de virulence extracellulaires sont les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A, la phospholipase C, la protéase IV, une lipase, les exoenzymes S, T et Y, l'exotoxine U, l'alginate et les exopolysaccharides, la pyocyanine, les sidérophores, l'acide cyanhydrique et les rhamnolipides (van Delden, 2004).

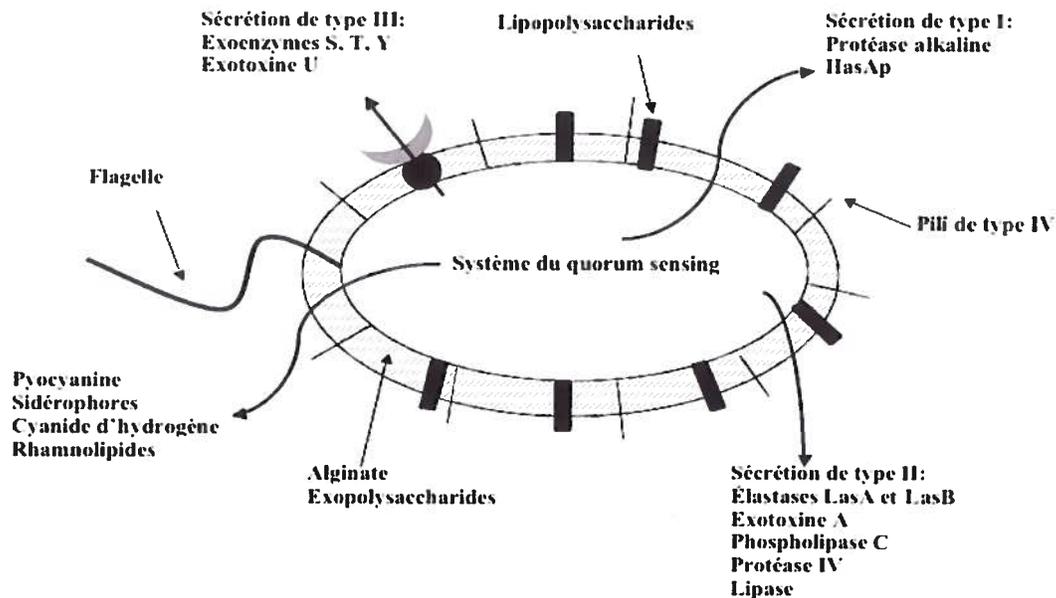


Figure 1.1 Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (d'après van Delden, 2004).

Le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* n'est pas relié à un seul facteur, mais à l'expression et à la combinaison de différents facteurs de virulence. Ils permettent la colonisation et la formation de biofilm, la nécrose des tissus, l'invasion et la dissémination dans le système vasculaire, tout comme l'activation locale et systémique de la réponse inflammatoire (van Delden, 2004). Des études *in vivo* basées sur l'étude de mutants déficients dans la production

individuelle de ces facteurs de virulence ont montré lesquels sont essentiels à la virulence de *P. aeruginosa* (Nicas et Iglewski, 1985).

Il existe trois systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa* (Fig. 1.1). La majorité des facteurs de virulence sont sécrétés par le système de sécrétion de type II. Il s'agit des élastases LasA et LasB, l'exotoxine A, des lipases, de la phospholipase C et de la protéase IV (Filloux, Michel et Bally, 1998). Ces produits sont cytotoxiques et peuvent avoir un effet sur des tissus éloignés du site d'infection. Il a été suggéré que le système de sécrétion de type II soit régulé par le quorum sensing (Chapon-Herve *et al.*, 1997). Le système de sécrétion de type I, aussi appelé système ABC, permet la sécrétion de la protéase alcaline (Letoffe, Redeker et Wandersman, 1998). Finalement, des produits cytotoxiques chez les cellules eucaryotes sont sécrétés par le système de sécrétion de type III. Il s'agit des exotoxines S, T, Y et U. Ce système utilise un appareil de sécrétion et de translocation pour injecter, lors d'un contact étroit, la protéine effectrice directement dans le cytoplasme de la cellule cible (Barbieri, 2000). Le mécanisme de sécrétion des rhamnolipides demeure toujours inconnu.

1.2 Les biosurfactants

Les biosurfactants sont des métabolites secondaires synthétisés par une grande variété de microorganismes. Ils présentent des propriétés tensioactives dues à leur structure amphipathique. Les biosurfactants ont la capacité de réduire les tensions de surface et d'interfaces entre les phases liquides, solides et gazeuses. Ces propriétés physico-chimiques rendent les biosurfactants intéressants pour de multiples applications dans les domaines de la biorestauration environnementale (nettoyage des sites pollués par des métaux lourds et des composés hydrocarbonés), la cosmétique (e.g. émulsifiant et stabilisateur dans les crèmes et les produits démaquillants), l'industrie pharmaceutique (e.g. liposomes ou transporteurs de médicaments), alimentaire (e.g. éliminer les pesticides des fruits et légumes ou nettoyer des machines), du papier (e.g. éliminer la résine), de la peinture (e.g. disperser les pigments) et du nettoyage (e.g. détergent).

1.2.1 La famille des rhamnolipides

1.2.1.1 Propriétés physico-chimiques

Les rhamnolipides sont des biosurfactants extracellulaires glycolipidiques, synthétisés par les bactéries du genre *Pseudomonas* et ils ont été très largement étudiés depuis leur découverte par Jarvis et Johnson (1949). Les rhamnolipides sont des molécules de faible poids moléculaire qui contiennent une ou deux molécules de rhamnose (Rha) liées à un ou deux acides 3-hydroxyalcanoïques liés entre eux par une liaison ester (Fig. 1.2).

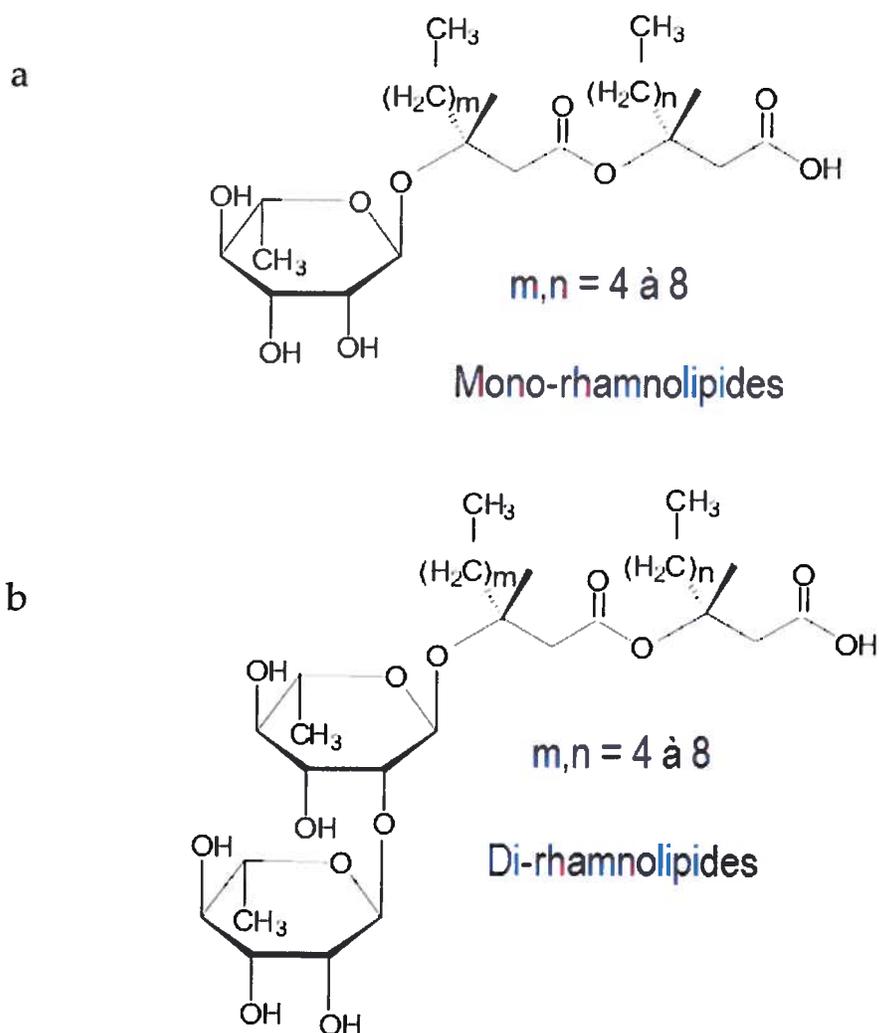


Figure-1.2. Les deux principales structures des rhamnolipides synthétisés par *P. aeruginosa*. (a) : l'acide L-rhamnosyl- β -hydroxyalcanoyl- β -hydroxyalcanoïque. (b) : l'acide L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxyalcanoyl- β -hydroxyalcanoïque. Les valeurs de n et m peuvent être identiques ou différentes.

Les chaînes carbonées sont de diverses longueurs comprises entre C₈ et C₁₂ et peuvent contenir une insaturation. *P. aeruginosa* génère comme produits majoritaires un dirhamnolipide, l'acide L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-β-hydroxydécanoyle-β-hydroxy-décanoïque (Rha-Rha-C₁₀C₁₀) et un monorhamnolipide, l'acide L-rhamnosyl-β-hydroxydécanoyle-β-hydroxydécanoïque (Rha-C₁₀C₁₀) (Déziel *et al.*, 2000 ; Déziel *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Les rhamnolipides comme facteurs de virulence

Les rhamnolipides sont retrouvés en grande concentration dans le sputum (sécrétions pulmonaires) des patients atteints de fibrose kystique et dont les bronches sont colonisées par *P. aeruginosa* (Kownatzki, Tummeler et Doring, 1987). Dans les bronches, les rhamnolipides inhibent le transport mucociliaire et les fonctions ciliaires de l'épithélium respiratoire. L'absence de ces fonctions facilite le maintien de la population bactérienne dans le poumon (Read *et al.*, 1992). Les rhamnolipides sont aussi reconnus pour inhiber la réponse phagocytaire des macrophages (McClure et Schiller, 1992) De plus, ils agissent comme hémolysines extracellulaires thermostables (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980). Enfin, ces biosurfactants sont soupçonnés de dissoudre les phospholipides, qui sont des surfactants normalement présents dans les poumons, et de les rendre accessibles à la phospholipase C, une deuxième hémolysine produite par *P. aeruginosa* (Liu, 1974).

1.2.1.3 Les biofilms et les rhamnolipides

En laboratoire, les bactéries sont généralement étudiées à l'état planctonique, en milieu liquide. Dans la nature, les bactéries sont plus fréquemment retrouvées sous forme de communautés bactériennes hétérogènes et structurées, organisées dans une matrice extracellulaire, appelées biofilm (i.e. films biologiques) (Davey et O'Toole, 2000 ; Donlan, 2002).

Comme plusieurs autres bactéries, *P. aeruginosa* a la particularité d'adhérer à diverses surfaces biologiques et abiotiques. Cet attachement à des surfaces est une cause de problèmes majeurs dans les domaines industriels et médicaux (Costerton *et al.*, 1995 ; Donlan, 2002). Bien que l'existence des biofilms soit documentée depuis des années pour différents microorganismes, *P. aeruginosa* est devenu le modèle-clé dans l'étude du développement des

biofilms chez les bactéries Gram-négatives (O'Toole, Kaplan et Kolter, 2000 ; Toutain *et al.*, 2004). La formation d'un biofilm se fait en cinq étapes (Figure 1.3), ce qui définit les biofilms comme des structures dynamiques et en constante interaction avec les stimuli environnementaux (Sauer *et al.*, 2002 ; Toutain *et al.*, 2004).

La formation d'un biofilm débute par un attachement réversible des cellules planctoniques sur une surface, suivi d'un attachement irréversible. Ensuite commence le développement des microcolonies dans une matrice extracellulaire composée essentiellement d'exopolysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines, où les cellules prolifèrent et/ou recrutent d'autres cellules planctoniques pour évoluer en macrocolonies. Ces dernières structures sont souvent représentées en forme de champignons entourés de canaux permettant une irrigation du biofilm pour distribuer les éléments nutritifs et structuraux essentiels à son maintien. Cependant la forme des biofilms matures dépend de nombreux facteurs environnementaux mais aussi des espèces bactériennes (Toutain *et al.* 2004). La dernière étape contribue au renouvellement du biofilm ou à la colonisation d'un nouveau biofilm, par un détachement de certaines cellules qui retournent à leur état phénotypique planctonique.

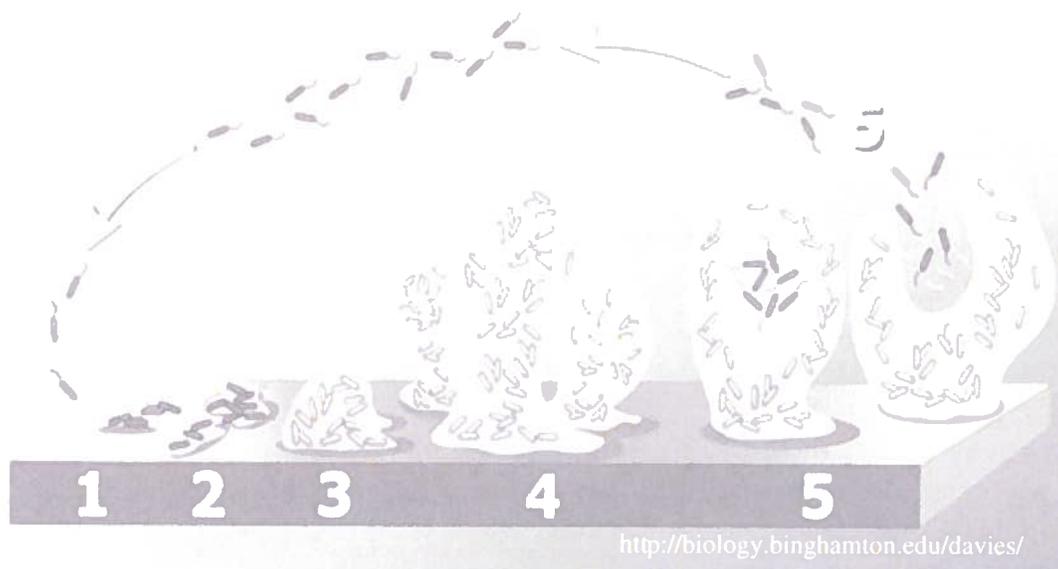


Figure 1.3- Modèle de développement d'un biofilm bactérien (d'après Sauer *et al.*, 2002). Cinq étapes de développement : (1) attachement réversible, (2) attachement irréversible, (3) maturation en microcolonies, (4) maturation en macrocolonies, et (5) dispersion des cellules.

Ce n'est que depuis les années 1980 que la communauté scientifique a développé un intérêt particulier pour ce type d'organisation cellulaire où la croissance, les phénotypes et les comportements physiologiques diffèrent grandement de l'état planctonique (Costerton *et al.*, 1995; Sauer *et al.*, 2002; Drenkard et Ausubel, 2002; Hall-Stoodley, Costerton et Stoodley, 2004; Vilain *et al.*, 2004). Les cellules étroitement associées dans un biofilm, sont capables de coordonner leur état physiologique et métabolique, à la manière d'un organisme multicellulaire (Caldwell, 2002; Costerton *et al.*, 1995; Shapiro, 1998), offrant ainsi plusieurs avantages à la population bactérienne. Cette matrice entourant le biofilm confère un certain degré de protection aux bactéries. L'une de ces particularités phénotypiques est une plus grande résistance aux antibiotiques que les cellules en suspension (Costerton *et al.*, 1995; Costerton, Stewart et Greenberg, 1999; Brooun *et al.*, 2000; Lewis, 2001; Drenkard et Ausubel, 2002). Des études ont démontré que le transfert de gènes est favorisé au sein du biofilm (Ghigo, 2001; Molin et Tolker-Nielsen, 2003), permettant ainsi l'échange rapide et efficace de gènes de résistance aux antibiotiques. La possibilité de former des biofilms confère à *P. aeruginosa* un avantage lors de l'infection et de la persistance dans l'hôte tout en contribuant à faire échouer les traitements antibiotiques (Fabian, 2000).

Une infection chronique à *P. aeruginosa* se traduit par le développement d'un biofilm (Pedersen *et al.*, 1992; Evans et Linker, 1973). Des études suggèrent que la formation de communautés sessiles et leur résistance aux antibiotiques est la cause d'infections persistantes et chroniques chez les patients atteints de la fibrose kystique (Costerton, Stewart et Greenberg, 1999). Plus de 90 % des souches de *P. aeruginosa* isolées de poumons de patients atteints de fibrose kystique ont un phénotype mucoïde (Govan et Deretic, 1996; Rowen et Deretic, 2000). La croissance de *P. aeruginosa* sous cette forme mucoïde à l'intérieur de la matrice d'exopolysaccharide permet de résister à plusieurs antibiotiques comme les aminoglycosides, les β -lactames, les fluoroquinolones ainsi qu'à des désinfectants (Govan et Deretic, 1996). La production d'exopolysaccharide peut protéger les cellules bactériennes contre le système immunitaire de l'hôte (Vuong *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* est un bon exemple de colonisation liée à la production d'exopolysaccharide dans les poumons infectés (Lyczak, Cannon et Pier, 2002). De plus, il a été démontré que la présence d'antibiotiques pouvait augmenter la production d'exopolysaccharide. Ainsi, les traitements antibiotiques peuvent devenir inefficaces et même dans certains cas promouvoir la formation de biofilms (Rashid *et al.*, 2000; Sailer, Meberg et Young, 2003).

Les rhamnolipides sont essentiels au maintien de l'architecture des biofilms (Davey, Caiazza et O'Toole, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). En effet, plusieurs études ont démontré que les rhamnolipides jouent un rôle important dans le maintien des canaux nutritionnels qui passent à travers les biofilms et qui sont essentiels à la survie des populations bactériennes ((Davey, Caiazza et O'Toole, 2003; Espinosa-Urgel 2003). Un mutant *rhlA* incapable de produire des rhamnolipides, est aussi incapable de maintenir l'architecture des canaux à l'intérieur des biofilms. De plus, les rhamnolipides pourraient prévenir la colonisation d'un biofilm de *P. aeruginosa* par d'autres espèces bactériennes (Davey, Caiazza et O'Toole, 2003). Cependant un excès de production des biosurfactants conduit soit à la destruction du biofilm soit à l'inhibition de la formation d'un nouveau biofilm (Mireles II, Toguchi et Harshey, 2001 ; Davey, Caiazza et O'Toole, 2003; Espinosa-Urgel, 2003 ; Kuiper *et al.*, 2004). Cette dernière conséquence pouvant être un mécanisme de défense contre l'invasion du biofilm par de nouvelles espèces bactériennes

1.2.1.4 L'hydrophobicité

Il est à noter que les rhamnolipides ont la particularité d'augmenter l'hydrophobicité cellulaire. En effet des études (Zhang et Miller, 1994 ; Al-Tahhan *et al.*, 2000) ont démontré que les rhamnolipides sont responsables de la perte des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries, ce qui augmente l'hydrophobicité de la surface cellulaire.

D'une manière générale, la surface cellulaire des microorganismes est chargée négativement, principalement à cause de la présence de groupements anioniques tels que les groupements phosphates et/ou carboxyliques (Simoni *et al.*, 2000 ; Ahimou *et al.*, 2002). Ainsi par adsorption à la surface cellulaire via les chaînes hydrocarbonées et en faible concentration (0.125 mM), les rhamnolipides sont capables d'altérer l'hydrophobicité cellulaire de certains microorganismes Gram-négatifs, Gram-positifs et levures (Yuan *et al.*, 2007 ; Zhong *et al.*, 2007).

1.2.1.5 Les bactéries productrices de rhamnolipides

Depuis une dizaine d'années, des souches bactériennes autres que *P. aeruginosa*, ont été caractérisées comme ayant la capacité de produire des rhamnolipides.

Sans oublier les souches bactériennes génétiquement modifiées, telles que *E. coli*, et *P. putida* et *P. fluorescens*, qui sont aussi capables de produire des rhamnolipides (Ochsner, Hembach et Fiechter, 1995 ; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006 ; Cha *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007).

Tableau 1.1. Différentes souches autres que *P. aeruginosa* capables de produire des biosurfactants de la famille des rhamnolipides.

Souches bactériennes :	Référence :
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Häussler <i>et al.</i> 1998
<i>Pseudomonas putida</i> 21BN	Tuleva <i>et al.</i> 2002
<i>Renibacterium salmoninarum</i> 27BN	Christova <i>et al.</i> 2004
<i>Tetragenococcus koreensis</i>	Lee <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NRRL B-30761	Gunther <i>et al.</i> 2005
<i>Burkholderia plantarii</i>	Andrä <i>et al.</i> 2006
<i>Pseudomonas sp.</i> GRP(3)	Sharma <i>et al.</i> 2007

1.2.2 La famille des dilipides

De récentes études (Lépine *et al.* 2002 ; Déziel *et al.* 2003) ont démontré que *P. aeruginosa* synthétisait une nouvelle classe de biosurfactants, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïques (HAAs), précurseurs des rhamnolipides (Fig. 1.4).

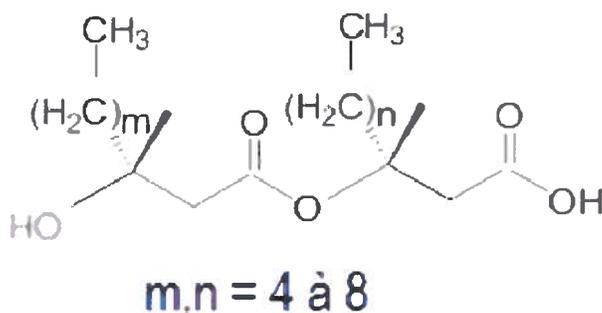


Figure 1.4. Structure des HAAs (acide β -hydroxyalcanoyl- β -hydroxyalcanoïque). Les valeurs de n et m peuvent être identiques ou différentes.

Déziel *et al.* (2003) ont su mettre en évidence que les HAAs présentent des propriétés biosurfactantes plus intéressantes que celles des rhamnolipides. En effet, les HAAs abaissent plus la tension de surface que les rhamnolipides pour des concentrations identiques (Fig. 1.5).

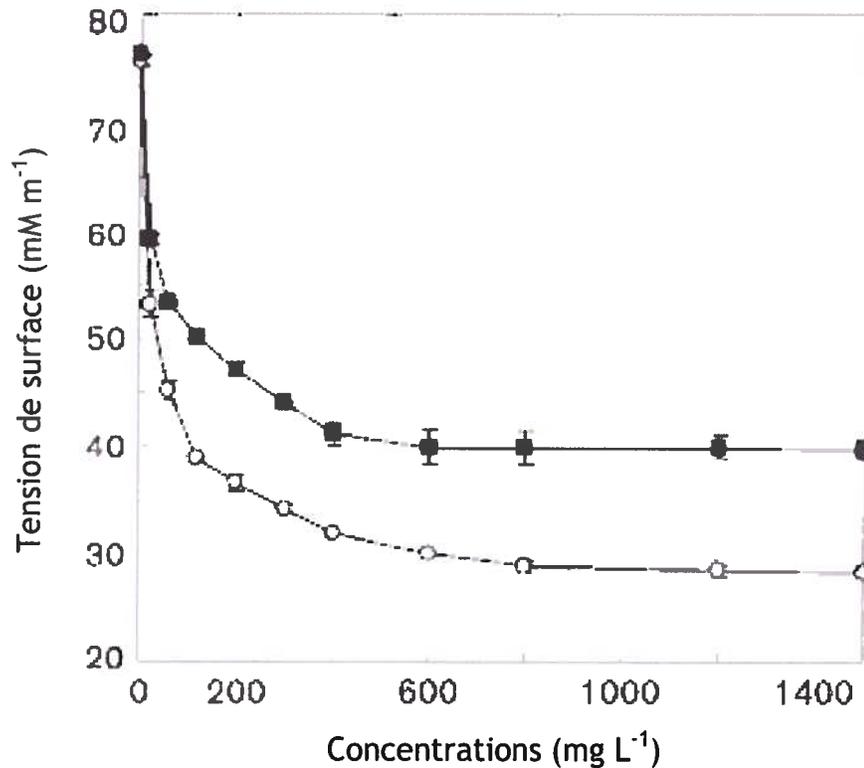


Figure 1.5- Tension de surface des rhamnolipides et des HAAs (d'après Déziel *et al.*,2003). Les carrés pleins représentent les rhamnolipides purifiés d'une culture de PG201 ; les cercles vides représentent les HAAs extraits d'une culture de UO287.

Ainsi les HAAs ne semblent pas être que de simples intermédiaires dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides. Ils présentent des caractéristiques utiles au fonctionnement de *P. aeruginosa* ainsi que de nombreux intérêts pour l'industrie et le domaine médical.

1.3 La voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*

1.3.1 Les gènes *rhlABC*

Les gènes *rhlAB* et *rhlC* (Fig. 1.6) sont les principaux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides (Ochsner, Fiechter et Reiser, 1994; Rahim *et al.*, 2001). Seuls les gènes *rhlB* et *rhlC* ont été entièrement caractérisés.

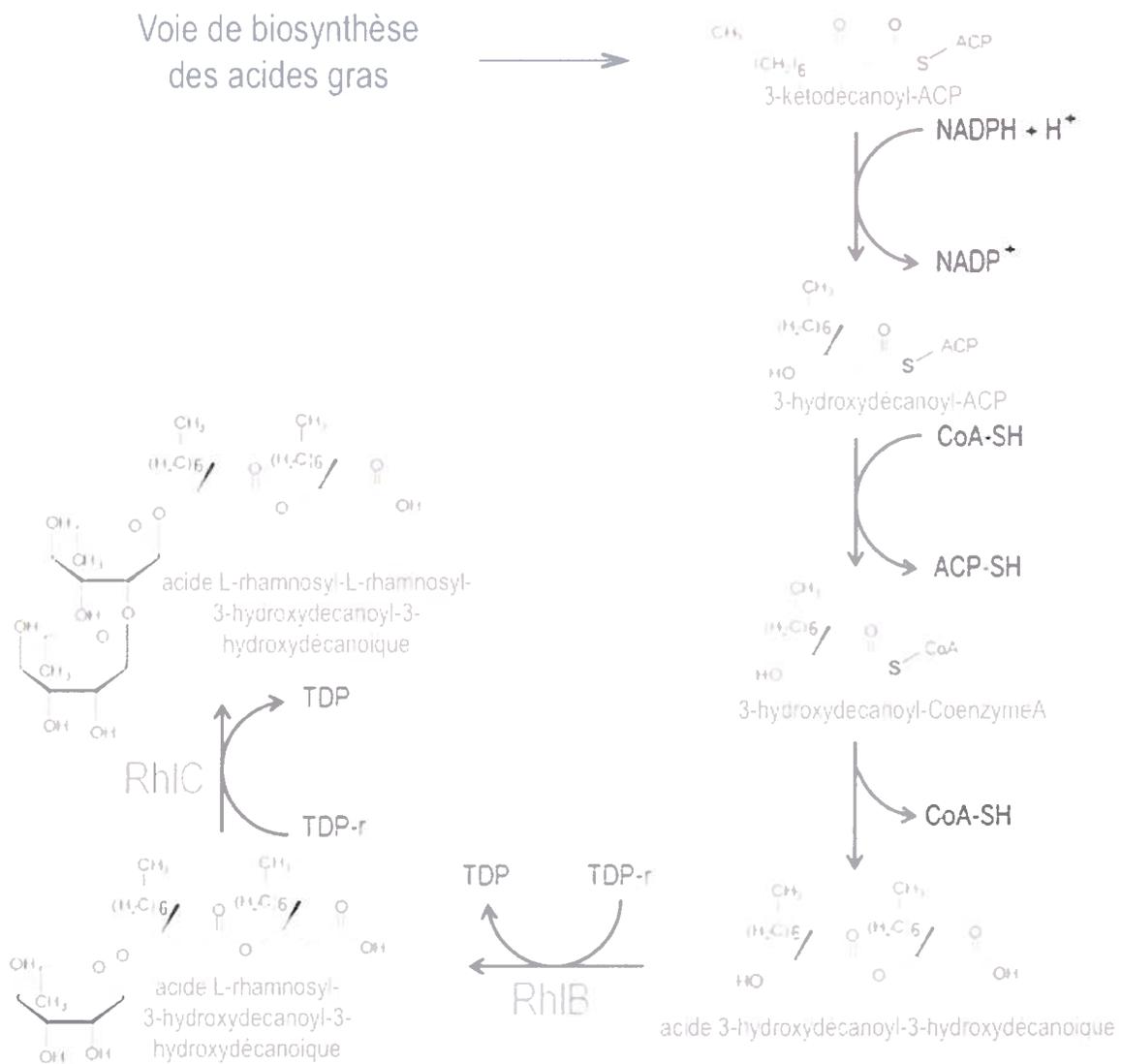


Figure 1.6. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des rhamnolipides (modifiée de Campos-Garcia *et al.* 1998). La fonction cétone de l'ester ACP de l'acide 3-cétodécanoïque résultant de la voie de biosynthèse des acides gras est réduite en 3-hydroxydécanoyle-ACP. ACP : Acyl Carrier Protein, CoA-SH : coenzyme A, r : rhamnose, TDP : thymidine 5'-diphosphate.

Le gène *rhB* code pour la rhamnosyltransférase 1 qui catalyse le transfert du thymidine 5'-diphosphate(TDP)-rhamnose sur le B-hydroxyalcanoyl-B-hydroxyalcanoate (Ochsner, Fiechter et Reiser, 1994). Le gène *rhC* code pour la rhamnosyltransférase 2 qui catalyse le transfert du TDP-rhamnose sur le L-rhamnosyl-B-hydroxyalcanoyl-B-hydroxyalcanoate (Rahim *et al.*, 2001). Ochsner, Fiechter et Reiser (1994) ont émis l'hypothèse que RhIA serait impliqué dans la synthèse ou le transport des substrats de la rhamnosyltransférase RhIB, ou qu'il serait nécessaire pour la stabilisation de RhIB dans la membrane cytoplasmique. Mais nous verrons plus loin que d'autres hypothèses ont été formulées sur le rôle de ce gène.

1.3.2 Le gène rhIA

Récemment, Déziel *et al.* (2003) ont mis en évidence que le gène *rhIA* de l'opéron *rhIAB* est indispensable pour la production des HAAs (Tableau 1.2). On a retrouvé de faibles quantités de HAAs dans le milieu d'une culture de la souche sauvage PG201, aucun dans le milieu de culture d'un mutant dérivé *rhIA*⁻ (UO299), mais de fortes concentrations dans le milieu de culture d'un mutant *rhIB*⁻ (UO287).

Tableau 1.2. Mise en évidence que *rhIA* est impliqué dans la production des HAAs.

Souches utilisées	Schémas de la mutation	Gènes exprimés	Biosurfactants synthétisés
PG201 Souche sauvage		<i>rhIA</i> & <i>rhIB</i>	rhamnolipides & dilipides
Mutant <i>rhIA</i> ⁻ Souche UO299		Mutation polaire*	—**
Mutant <i>rhIB</i> ⁻ Souche UO287		<i>rhIA</i>	dilipides

* mutation polaire : mutation non-sens localisée dans un des premiers cistrons de l'opéron et provoquant un arrêt de la transcription des cistrons en aval. Une mutation non-sens dans *rhIA* empêche la transcription de *rhIA* mais aussi de *rhIB*.

** - : aucune production de biosurfactants

Bien que la fonction exacte de RhIA ne soit pas encore connue, des études comparatives des séquences aminées (Blastp) ont révélé de fortes identités (de 41 à 51%) et homologies (de 60 à 70%) de séquence avec PhaG. Cette dernière enzyme est une hydroxyacyl ACP :CoA transacylase directement impliquée dans la voie de biosynthèse des polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de la voie de synthèse *de novo* des acides gras (Rehm, Kruger et Steinbuchel, 1998 ; Rehm, Mitsky et Steinbuchel, 2001 ; Hoffmann, Steinbuchel et Rehm, 2000 ; Hoffmann *et al.*, 2002). D'autres similarités avec PhaG se retrouvent notamment dans les profils d'hydrophobicité (méthode Kyte-Doolittle) et les prédictions des structures secondaires (PSI-pred). De plus, RhIA et PhaG présentent des caractéristiques communes à la grande famille des alpha/beta hydrolases (abhydrolase 1) et ont des masses moléculaires similaires (32,9 KDa pour RhIA et 33,8 KDa pour PhaG).

1.4 Le quorum sensing

La régulation génétique de la production des rhamnolipides est dépendante de la densité cellulaire et contrôlée par le système de quorum sensing (Maier et Soberon-Chavez, 2000).

1.4.1 Un système de communication intercellulaire

Le quorum sensing (QS) permet de réguler l'expression des gènes en réponse à la densité cellulaire. Cette régulation permet aux cellules individuelles d'agir de manière coordonnée et en synergie. Ce système de communication intercellulaire sert à l'instauration d'une dynamique de croissance et à l'utilisation des ressources nutritives (Fuqua, Winans et Greenberg, 1994). Il est défini par la production de phéromones de faible poids moléculaire, que l'on appelle autoinducteurs. La nature des autoinducteurs varie selon les systèmes de QS. Leur caractère commun est l'activation transcriptionnelle d'un régulon de gènes contrôlés par le QS lorsque le seuil ou la concentration minimale d'un autoinducteur spécifique est atteint. En effet, l'accumulation de ces phéromones bactériennes permet aux cellules de détecter la densité de leur population dans un environnement précis. Lorsqu'une certaine concentration seuil en phéromones est atteinte, il peut y avoir initiation d'une réponse phénotypique concertée de la population (Fuqua, Winans et Greenberg, 1994).

La production de facteurs de virulence extracellulaires par un petit nombre de bactéries peut mener à une activation du système immunitaire de l'hôte. Cependant l'expression coordonnée des gènes de virulence par toute une population bactérienne peut permettre une production massive de facteurs extracellulaires permettant de neutraliser les défenses de l'hôte. (van Delden et Iglewski, 1998).

1.4.2 Le quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Le quorum sensing régule différents événements chez *P. aeruginosa* dont la formation de biofilms, l'adaptation et la survie en phase stationnaire, ainsi que la production de facteurs de virulence et de métabolites secondaires tels que les rhamnolipides (Davies *et al.*, 1998).

Chez *P. aeruginosa*, il existe deux systèmes de quorum sensing, *las* et *rhl* (Fig. 1.7). Chacun de ces systèmes comprend un régulateur transcriptionnel, LasR et RhIR, ainsi qu'une AHL synthase, LasI et RhII (Pesci *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1995).

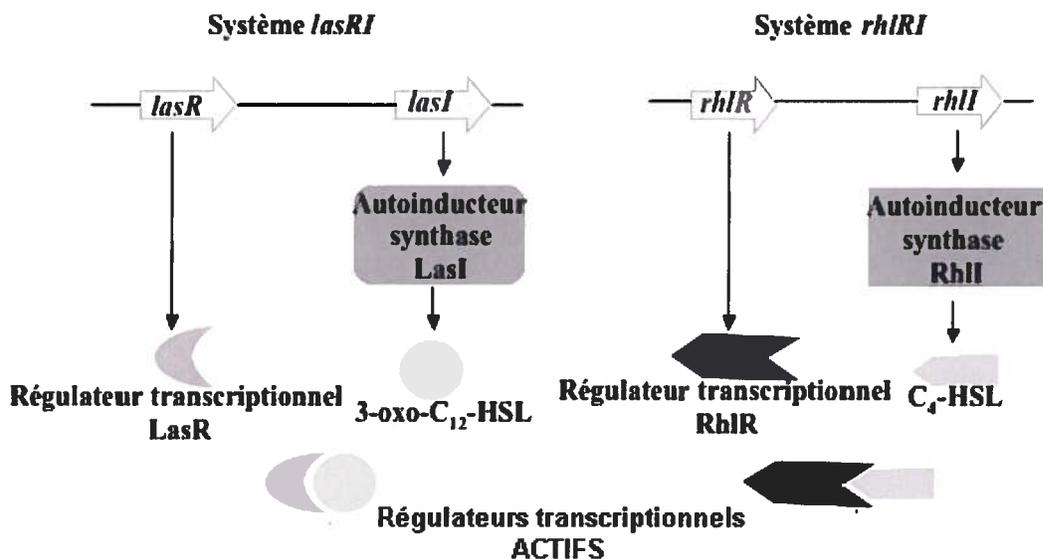


Figure 1.7 Quorum sensing chez *P. aeruginosa*. Les deux systèmes *las* et *rhl* Adaptation d'après Juhas, Eberl et Tumbler (2005).

Les signaux extracellulaires agissant dans le système de quorum sensing de *P. aeruginosa*, sont les N-acyl-L-homosérine lactones (Fuqua, Parsek et Greenberg, 2001). *P. aeruginosa* est l'un

des modèles les mieux étudiés pour ses acyl homosérines lactones (Pesci *et al.*, 1999). Les produits des gènes *lasI* et *rhlI*, sont les autoinducteurs, respectivement le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) ainsi que le N-butyroyl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) (Figure 1.8) (Pearson *et al.*, 1994 et Pearson *et al.*, 1995).

Le système *las* régule le système *rhl* en formant une cascade d'activation transcriptionnelle (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). La paire d'autoinducteurs synthase et de régulateurs transcriptionnels LasRI et RhlRI dirigent ainsi l'expression de plusieurs gènes, incluant des facteurs de virulence, en réponse à l'augmentation de la concentration de l'oxo-C₁₂-HSL et du C₄-HSL (Pesci *et al.*, 1999). Ainsi, *P. aeruginosa* produit et répond à l'émission d'autoinducteurs et d'autres signaux intercellulaires qui régissent sa pathogénicité en coordonnant l'expression de gènes de virulence (Rumbaugh, Griswold et Hamood, 2000; de Kievit et Iglewski, 2000; Smith et Iglewski, 2003).

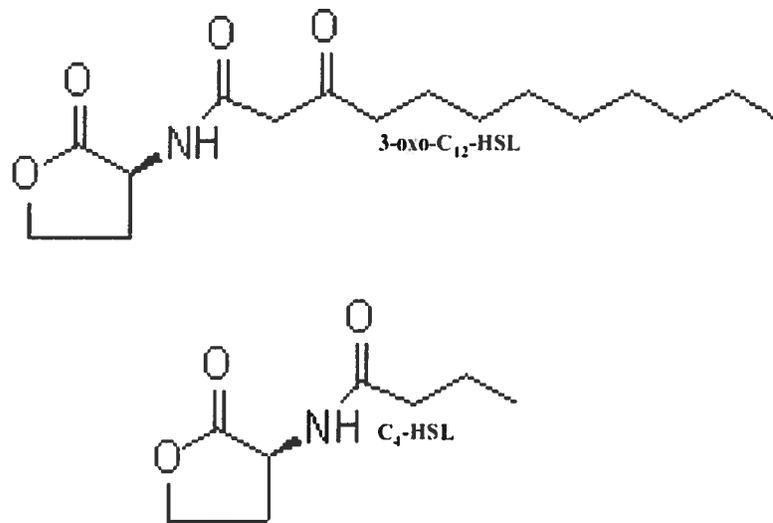


Figure 1.8 Les acylhomosérines lactones chez *P. aeruginosa*. Les autoinducteurs des systèmes *las* et *rhl*, le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) et le N-butyroyl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) respectivement. D'après Pearson *et al.* (1994).

Donc, en cas de faible densité cellulaire, les autoinducteurs sont synthétisés à un niveau très bas. (Pearson, van Delden et Iglewski, 1999). Il en résulte donc une absence de transcription de gènes de virulence. Avec l'augmentation de la densité cellulaire, les deux autoinducteurs s'accumulent dans le milieu jusqu'à ce que leur concentration intracellulaire atteigne un

certain seuil de concentration. Une fois la concentration critique atteinte, les autoinducteurs vont se lier à leur régulateur transcriptionnel correspondant (Fuqua, Winans et Greenberg, 1996). Le complexe régulateur transcriptionnel-autoinducteur va se fixer à une séquence d'ADN spécifique en amont du gène cible, permettant d'amplifier sa transcription (Stevens, Dolan et Greenberg, 1994; Stevens et Greenberg, 1997). Ce système permet alors aux cellules bactériennes de communiquer entre elles, d'évaluer leur propre densité et d'agir de manière coordonnée en exprimant spécifiquement différents gènes en tant que population et non plus comme cellules individuelles (van Delden et Iglewski, 1998).

1.4.3 La régulation de la production des rhamnolipides

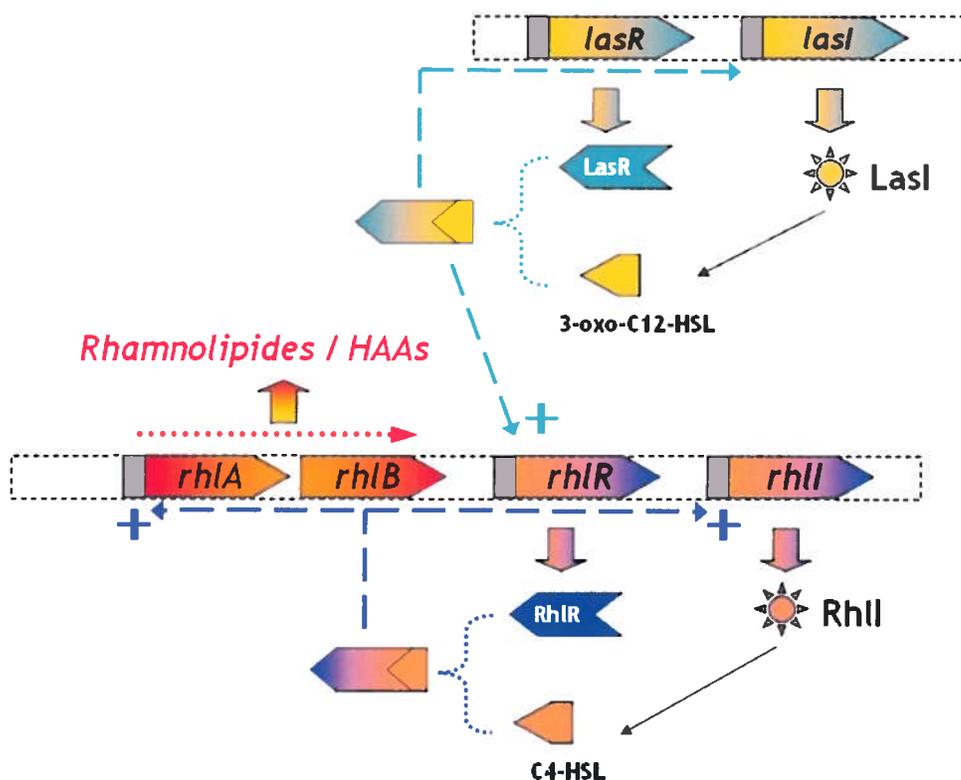


Figure 1.9. Modèle de régulation de l'opéron *rhlAB* chez *P. aeruginosa*. L'opéron *rhlAB* est impliqué dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides et des dilipides (HAAs). LasR et RhlR sont des régulateurs transcriptionnels qui sont activés après hétéro-dimérisation avec les autoinducteurs LasI et RhlI (respectivement). *lasI* et *rhlI* codent pour des autoinducteurs synthétases. LasI active la synthèse du N-3-oxo-dodécanoyl-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) et RhlI celle de la N-butanoyl-homosérine lactone (C₄-HSL). D'après Sullivan, 1998.

Les gènes *rhlAB* et *RhlC* sont régulés par les systèmes *las* et *rhl* du quorum-sensing (Oschner *et al.* 1994, Pearson, Pesci et Iglewski, 1997, Medina *et al.* 2003a/b et Rahim *et al.* 2001). L'opéron *rhlAB* est sous le contrôle de RhlR. Une récente étude a d'ailleurs démontré que lorsque le régulateur RhlR n'était pas complexé à la C4-HSL, il agissait comme répresseur sur l'expression de *rhlAB* (Figure 1.9) (Medina *et al.* 2003a).

CHAPITRE 1

Optimisation des conditions de culture de *P. aeruginosa* pour la production des biosurfactants

2.1. OBJECTIFS

La nature du milieu de culture et les facteurs environnementaux sont des paramètres importants dans la production des rhamnolipides (Nitschke, Costa et Contiero, 2005 ; Desai et Banat, 1997). D'une manière générale la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote sont les facteurs les plus limitants. En effet les sources de carbone hydrosolubles, telles que le glucose, le glycérol, le mannitol, ou l'éthanol sont souvent utilisées pour produire des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. Cependant elles sont moins efficaces que les sources de carbones liposolubles telles que les n-alcanes ou les huiles. D'après Robert *et al* (1989) le mannitol et l'huile d'olive seraient les sources de carbone les plus efficaces pour chacune des deux catégories, hydrosoluble et liposoluble.

Pour ce qui est des sources d'azote, le nitrate, le glutamate et l'aspartate ont été répertoriés comme étant d'excellents promoteurs de la production des rhamnolipides, alors que la glutamine et l'ammonium inhibent la production (Mulligan et Gibbs 1989; Venkata Ramana et Karanth, 1989 ; Köhler *et al.*, 2000). De plus le quotient C/N a une influence sur la production (Guerra-Santos, Käppeli et Fiechter, 1984 ; Desai et Banat 1997). Selon certaines études, le quotient C/N optimal peut varier en fonction des sources de carbone et d'azote utilisées mais aussi en fonction des souches et selon qu'elles sont cultivées dans des bioréacteurs ou non (Haba *et al.*, 2000 ; Santa Anna *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2007).

La température, le pH et l'oxygénation (dépendante de la vitesse d'agitation) sont aussi des paramètres importants à contrôler. En effet les rhamnolipides sont produits entre des pH de 6 à 7, à une température variant de 30°C à 37°C, selon les souches, et avec une oxygénation optimale que l'on peut avoir à 350 rpm (Nitschke, Costa et Contiero, 2005). Cependant Chayabutra, Wu et Ju (2001) ont démontré qu'il était quand même possible d'obtenir une production significative de rhamnolipides en absence d'oxygène.

De plus, *P. aeruginosa* aura tendance à augmenter sa production en rhamnolipides lorsqu'elle se trouvera en conditions stressantes. Des nombreuses études ont montré que lorsque la concentration en azote est limitée, la production de biosurfactants augmente (Mulligan et Gibbs 1989 ; Venkata Ramana et Karanth, 1989). Il en est de même lorsque le milieu est limité en fer et en phosphate (Mulligan, Mahmoudides et Gibbs, 1989).

L'objectif du volet de cette étude est d'arriver à optimiser le milieu minimal SW, limité en fer et mis au point par Déziel et al. (1996), de façon à, soit augmenter la production en biosurfactant, soit accélérer la production, c'est à dire obtenir une même production de biosurfactants en moins de temps qu'à partir du milieu SW standard. Pour ce faire, différentes sources de carbone et d'azote seront testées. Aussi, les concentrations en phosphate et en azote seront modulées. Les suivis de la croissance cellulaire de PG201 et du pH du milieu de culture seront effectués en parallèle du suivi dans le temps de la production des biosurfactants. Chaque classe de biosurfactants produits par *P. aeruginosa* (les di-rhmanolipides, les mono-rhmanolipide et les dilipides) est composée d'une dizaine de molécules différentes. Ainsi, pour faciliter l'analyse des effets des changements du milieu de culture, seuls les composés majoritairement produits pour chaque classe sont suivis et analysés par spectrométrie de masse.

2.2. METHODOLOGIE

2.2.1. Souches bactériennes utilisées dans cette étude

La souche environnementale PG201 de *Pseudomonas aeruginosa* a été aimablement fournie par le Dr. Eric Déziel (Groupe de microbiologie de l'environnement, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada). À l'origine cette souche se nommait DSM2659, et a elle été isolée par Guerra-santos *et al.* (1984) à partir d'un échantillon de sol provenant de l'Institut de Technologie Fédéral Suisse.

2.2.2. Le milieu minimal SW

La production de biosurfactants par *P. aeruginosa* est principalement étudiée dans le milieu SWF, un milieu minimal limité en fer (Déziel *et al.*, 1999). Le mannitol (20 g/L), seule source de carbone, est mélangé à 0.7 g/L de NaH_2PO_4 , 0.9 g/L de Na_2HPO_4 et 2 g/L de NaNO_3 . Avant autoclavage, le pH est ajusté à 6.7. Le milieu de culture est ensuite complété avec 0.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 0.001 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dont les solutions mères sont stérilisées par filtration (0.2 μm). Les cultures de 50 ml des souches PG201, PA01 et 57RP sont incubées à 30°C sous agitation constante à 150 rpm pendant 7 jours. Toutes les cultures sont faites en triplicata.

2.2.3. Sources de carbone et d'azote

La souche PG201 est testée pour optimiser sa production en biosurfactants. Pour cela le milieu minimal SW normalement utilisé est modifié. Les sources de carbone et d'azote sont modifiées tout en respectant la molarité des atomes de carbone et d'azote retrouvés dans le milieu SW original. Ainsi en remplacement du mannitol sont utilisés, 19.78 g/L de glucose, 32.29 g/L de citrate, 8.5 g/L d'éthanol. Le glutamate est utilisé soit comme une double source de carbone et d'azote (24.64 g/L) privilégiant l'équimolarité de la source de carbone, soit uniquement comme source d'azote (85.6 g/L) en présence de mannitol. Toutes les cultures sont faites en triplicata dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu minimal modifié. Elles sont incubées à 30°C sous agitation constante à 150 rpm pendant 6 jours.

2.2.4. Variation des concentrations en phosphate et azote

Dans le même objectif d'optimiser la production de biosurfactants de la souche PG201 dans le milieu SWF, les concentrations en phosphate et en azote sont optimisées. La concentration en azote est diminuée d'un facteur 10 (200 mg/L de NaNO_3), et la concentration en phosphate est diminuée d'un facteur 10 (70 mg/L de NaH_2PO_4 , 90 mg/L de Na_2HPO_4) et d'un facteur 100 (7 mg/L de NaH_2PO_4 , 9 mg/L de Na_2HPO_4). Toutes les cultures sont faites en triplicata dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu minimal modifié. Elles sont incubées à 30°C sous agitation constante à 150 rpm pendant 10 jours.

2.2.5. Les courbes de production des biosurfactants

Toutes les 24 h, un échantillon de 1 ml est prélevé, puis centrifugé afin de récupérer le surnageant de culture, dont 500 μl sont ajoutés à un volume équivalent d'une solution d'acétonitrile 80 % contenant 4 mM d'acétate d'ammonium et 20 ppm d'acide 16-hydroxydécanoïque comme standard interne. Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie en phase liquide (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM).

2.2.6. Les courbes de croissance et de pH

La croissance bactérienne, est mesurée toutes les 24 heures par densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm. Pour mesurer la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ et le pH du milieu de culture, un échantillon est prélevé, puis centrifugé. Les courbes de croissance et de pH ont été réalisées à partir de cultures faites en triplicata.

2.2.7. Extraction des biosurfactants

Dans un premier temps, le surnageant de culture contenant les biosurfactants est acidifié (pH 2 final) avec du HCl concentré, pour faire précipiter les biosurfactants. Ensuite, il est transféré dans une ampoule de décantation et soumis à 3 lavages successifs à l'acétate d'éthyle avec un tiers du volume de la phase aqueuse. Les phases organiques sont regroupées, déshydratées avec quelques grammes de sulfate de sodium Na_2SO_4 , puis transférées dans un

ballon pour être évaporées à l'évaporateur rotatif dans un bain-marie à 30°C. Le solvant est ensuite complètement éliminé sous vide à l'aide d'une pompe à huile pendant plus de 8 h. Selon les besoins ultérieurs d'expérimentation, l'extrait est resuspendu dans du méthanol ou de l'eau milli-Q à pH basique puis conservé à - 20°C.

2.2.8. Analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Les rhamnolipides et les dilipides ont été analysés avec un système de chromatographie liquide à haute performance HP 1100 (Agilent Technologies, Kirkland, Canada) équipé d'un injecteur automatique HP G1313A et d'une colonne (150 x 4 mm) à phase inverse C8 de type Zorbax (taille particulaire de 5 µm), reliée à un spectromètre de masse à triple quadripoles de type Quattro II (Micromass Canada, Pointe-Claire), équipé d'une interface de nébulisation Z-Spray.

Les composantes des échantillons sont éluées par un gradient eau-acétonitrile contenant une concentration constante d'acétate d'ammonium à 2 mM. La composition initiale du solvant est de 70% d'eau pour 30% d'acétonitrile et est maintenue pendant 2 minutes. Un changement linéaire du gradient s'effectue sur 10 minutes jusqu'à 100 % d'acétonitrile. Ce solvant est maintenu pendant 4 minutes additionnelles, puis le retour aux conditions initiales se fait en 1 minute peut être maintenues pendant 3 minutes. Le gradient est pompé à travers la colonne à un débit de 400 µl/min et le débit réduit du dixième dans un séparateur en T (Valco, Schenkon, Switzerland). Le volume d'échantillon injecté pour les analyses varie de 20 à 80 µl. Les analyses sont effectuées par électronébulisation en mode négatif. Le voltage du capillaire est de 3 500 V et le voltage du cône à 30 V. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation et de séchage à un débit de 20 et 200 ml/minute, respectivement. La température à la source est maintenue à 120°C, alors que celle du gaz d'évaporation est maintenue à 150°C. Le balayage effectué varie de 100 à 1 000 m/z .

La quantification est effectuée en mesurant l'aire sous la courbe des chromatogrammes correspondants aux ions pseudomoléculaires et leurs fragments ainsi que du standard interne. Ce quotient est multiplié par la concentration du standard interne ajouté.

2.3. RESULTATS

2.3.1. Variation des sources de carbone et d'azote dans le milieu SW

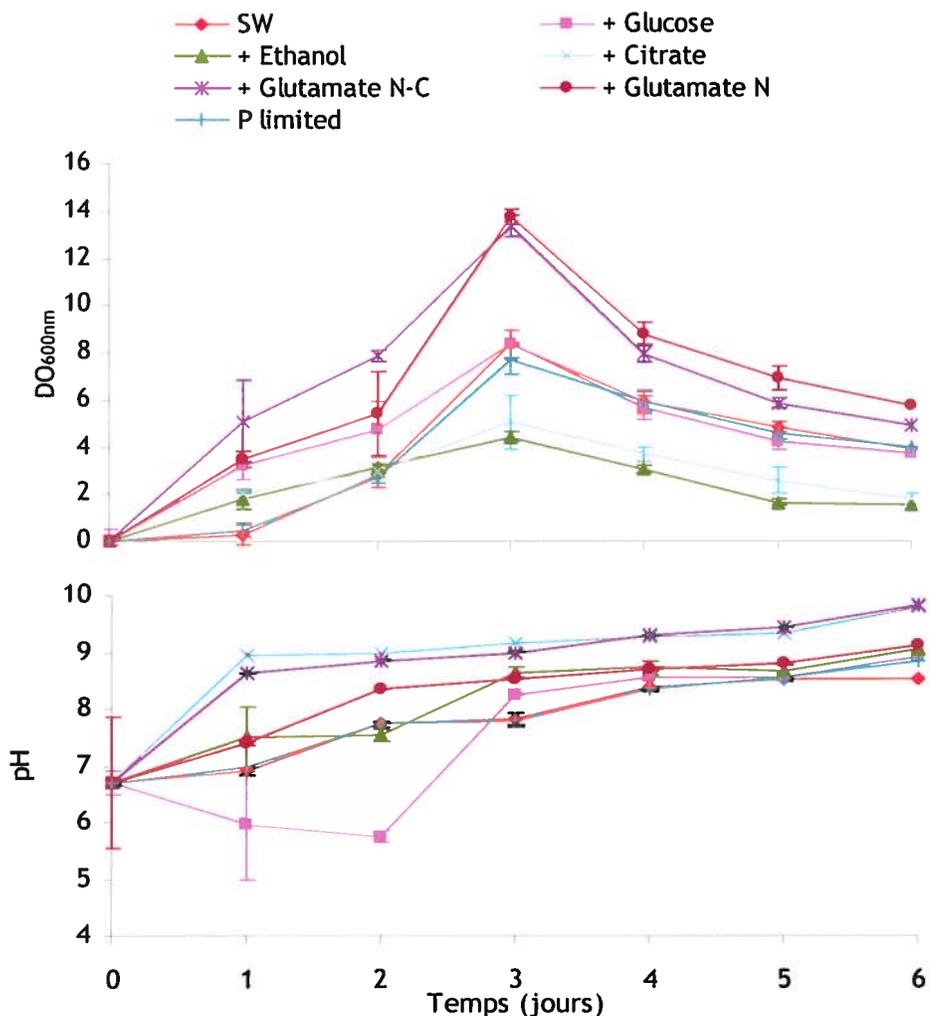


Figure 2.1 Courbes de croissance de la souche PG201 dans le milieu SW selon les sources de carbone (mannitol, éthanol, glucose, citrate et glutamate) et d'azote (glutamate) utilisées, et suivis dans le temps du pH des milieux de culture.

Selon la figure 2.1 il ne semble pas y avoir de corrélation entre le pH du milieu de culture et la croissance bactérienne. Peu importe les milieux de culture, PG201 atteint une croissance optimale au bout de 3 jours.

Le glucose comme source de carbone et la limitation d'un dixième en phosphate ne semblent pas significativement affecter la croissance de PG201 (DO_{600nm} de 5.9), sauf que la présence de glucose raccourcit la phase de latence.

L'éthanol et le citrate ont tendance à ralentir et diminuer la croissance (DO_{600nm} de 4.40 ± 0.1 et 5.03 ± 1.37 respectivement à 3 jours), alors que le glutamate, ajouté aussi bien en source d'azote uniquement ou en sources d'azote et de carbone simultanées, stimule et augmente considérablement la croissance de PG201 atteignant jusqu'à une DO_{600nm} de $13.73 (\pm 1.76)$.

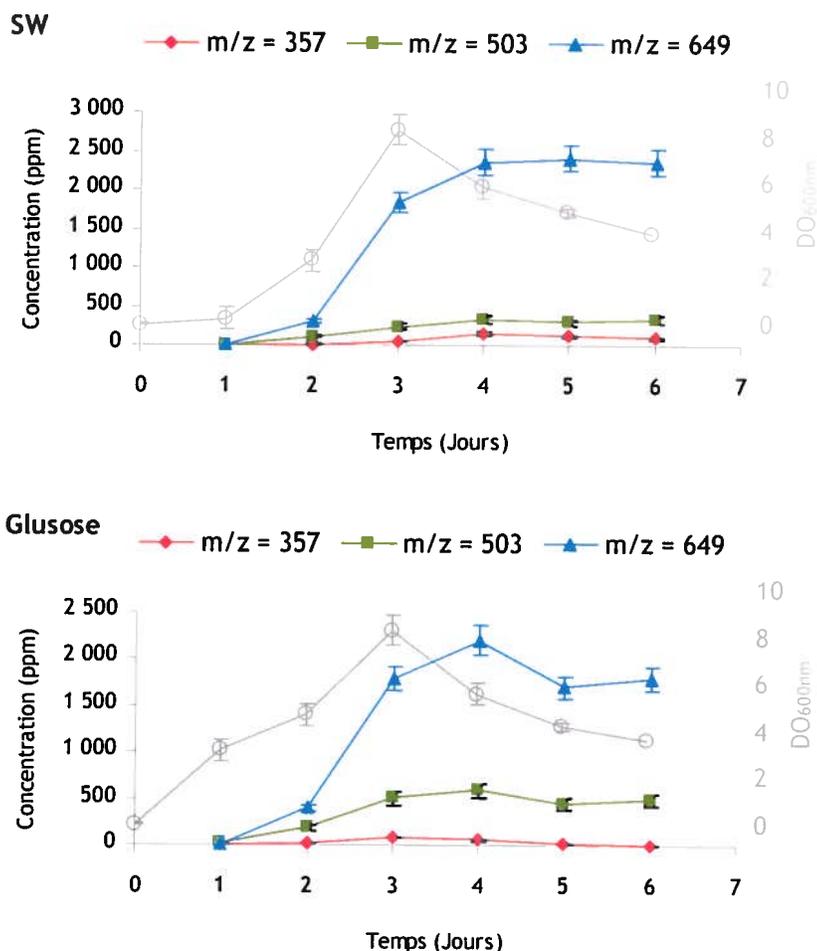


Figure 2.2 -Production des dilipides et des rhamnolipides en fonction de différentes sources de carbone. A- Production dans le milieu standard SW. B- Production dans le milieu minimal contenant 5% de glucose. Les ions pseudomoléculaires (m/z) 357, 503 et 649 correspondent respectivement aux dilipide $C_{10}C_{10}$, mono-rhamnolipide $R-C_{10}C_{10}$ et di-rhamnolipide $RR-C_{10}C_{10}$.

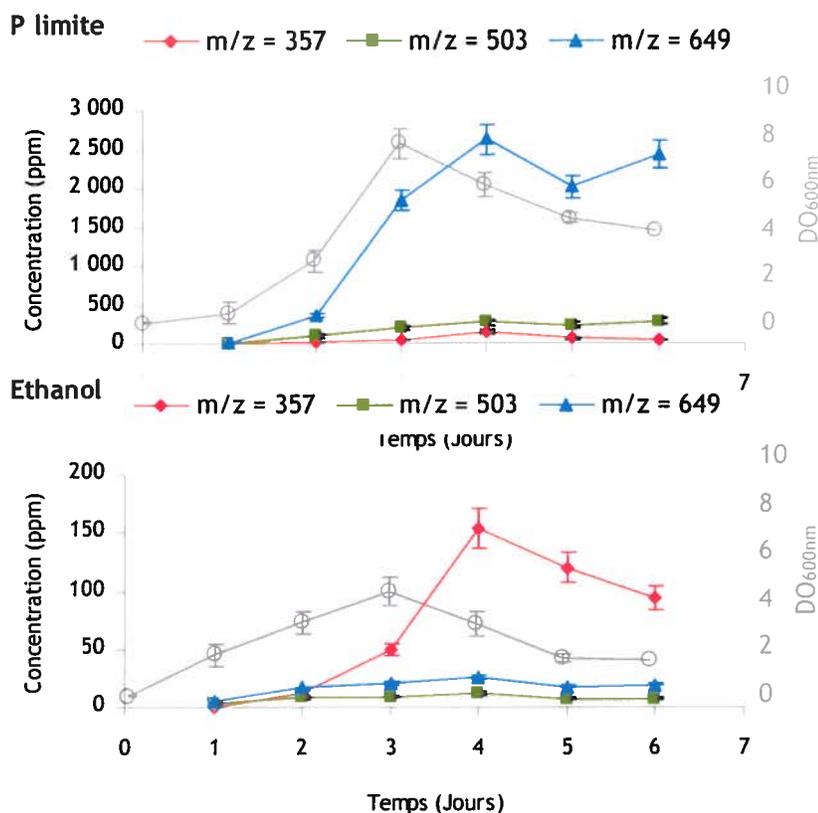


Figure 2.3 -Production des dilipides et des rhamnolipides dans le milieu SW et ses variantes. A- Production dans le milieu SW dont la concentration en phosphate est diluée d'un facteur 10. B- Production dans le milieu minimal contenant 5 % d'éthanol Les ions pseudomoléculaires (m/z) 357, 503 et 649 correspondent respectivement aux dilipides C₁₀C₁₀, mono-rhamnolipide R-C₁₀C₁₀ et di-rhamnolipide RR-C₁₀C₁₀.

Les milieux citrate et glutamate n'ont montré aucune production de rhamnolipides. Les figures 2.2 et 2.3 montrent l'effet du glucose de l'éthanol et de la limitation en phosphate sur la production des rhamnolipides et des dilipides. Dans tous les milieux, la production de biosurfactants est optimale après 4 jours et c'est dans le milieu SW que la production reste la plus performante. Cependant il est intéressant de noter que malgré la diminution en phosphate d'un facteur 10, la production de biosurfactants n'a pas été affectée et reste similaire à celle observée dans le milieu SW (Fig. 2.2). Par contre, même si la production en biosurfactants est faible en présence d'éthanol (Fig. 2.3), le composé majoritairement produit est le dilipide C₁₀C₁₀, contrairement aux autres milieux où c'est le di-rhamnolipide qui est produit majoritairement.

2.3.2. Milieu SW limité en phosphate et en azote

Afin d'optimiser la production des biosurfactants, on a voulu limiter les sources d'azote et de phosphate (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 -Composition des milieux de culture SW et ses variantes en sources de phosphate et d'azote. Les valeurs 1/10 et 1/100 indiquent que les sources en azote (N) et en phosphate (P) ont été diminuées d'un facteur 10 et 100 respectivement, par rapport aux concentrations initialement utilisées dans le milieu SW standard.

	SW	N 1/10	P 1/10	P 1/100
mannitol	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
NaNO ₃	2 g/L	200 mg/L	2 g/L	2 g/L
KH ₂ PO ₄	700 mg/L	700 mg/L	70 mg/L	7 mg/L
Na ₂ HPO ₄	900 mg/L	900 mg/L	90 mg/L	9 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	400 mg/L	400 mg/L	400 mg/L	400 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L

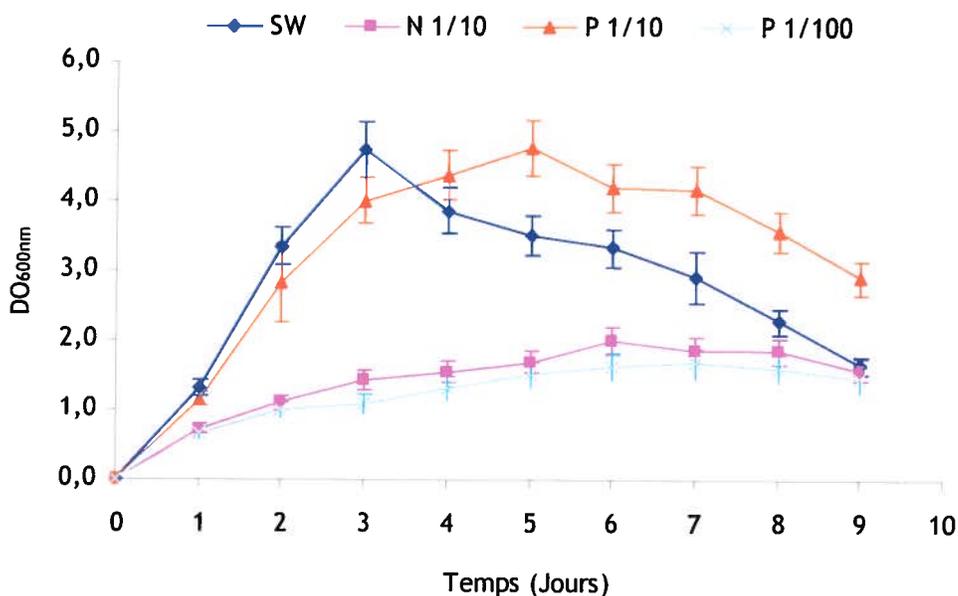


Figure 2.4 - Courbes de croissance de la souche PG201 dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P). Les valeurs 1/10 et 1/100 indiquent que les sources en azote (N) et en phosphate (P) ont été diminuées d'un facteur 10 et 100 respectivement, par rapport aux concentrations initialement utilisées dans le milieu SW standard

Selon la figure 2.4, on constate que limiter la source d'azote et diminuer de façon trop importante la source de phosphate, affecte significativement la croissance bactérienne de PG201 au cours du temps, qui reste à une DO_{600nm} de moins de 2.0. On constate aussi que la limitation en phosphate d'un facteur 10, prolonge la phase stationnaire de plusieurs jours, alors que dans le milieu SW, la population de PG201 commence à décliner après le 3^{ème} jour.

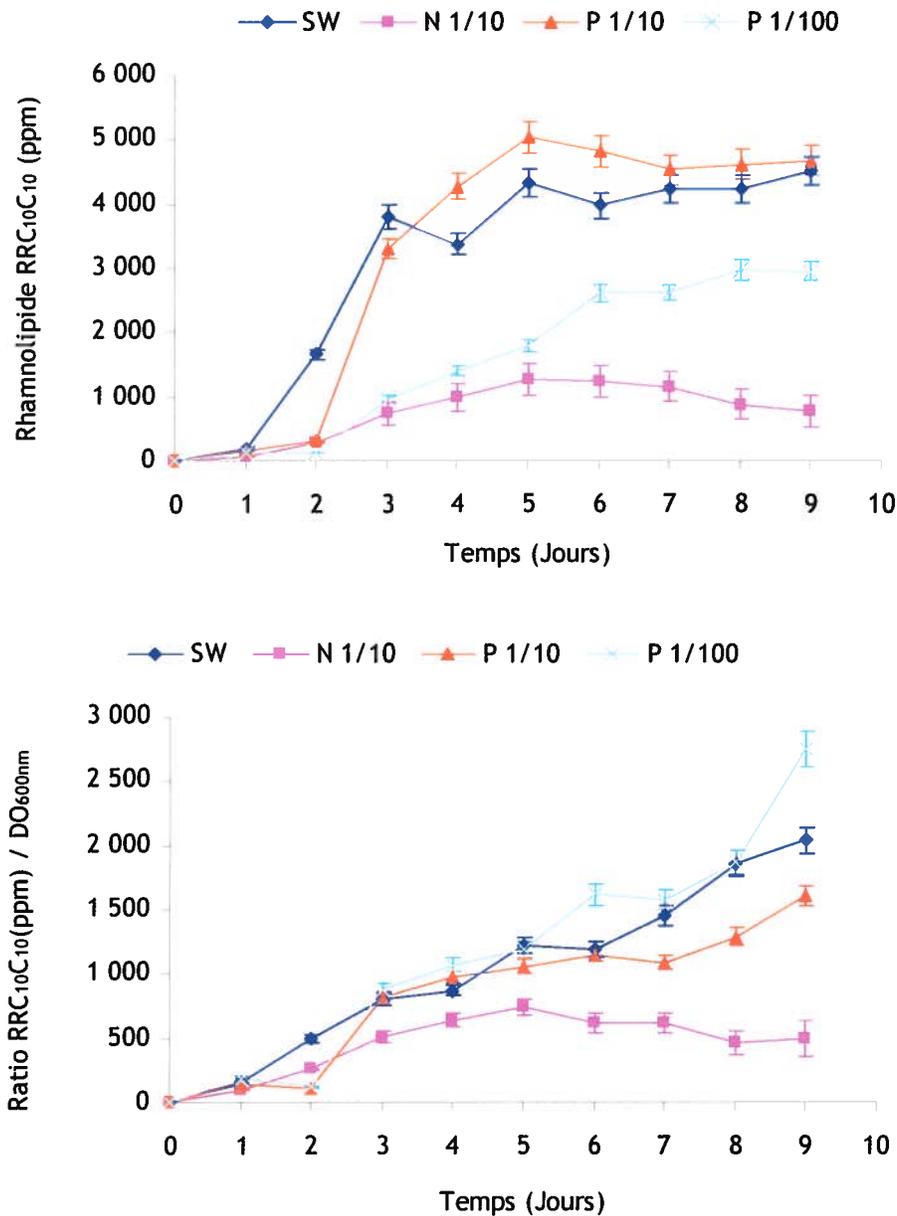


Figure 2.5 -Production des rhamnolipides dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P). A- Suivis de la production en fonction du temps. B- Suivis du rendement de production (rapport ppm/DO_{600nm}).

La figure 2.5 nous montre deux manières d’analyser et d’évaluer les performances de production des biosurfactants dans les milieux modifiés. En effet, si on regarde la production des biosurfactants au cours du temps (Fig. 2.5-A), c’est le milieu limité en phosphate d’un facteur 10 qui présente la meilleure production avec 5 049 ppm en 5 jours. Cependant le milieu SW présente une production similaire avec 4 321 ppm en 5 jours. Mais si on fait le suivi du rendement par densité cellulaire (Fig. 2.5-B), c’est le milieu le plus fortement limité en phosphate qui présente le meilleur rendement avec un taux de production de 258.58 ppm/jour/DO_{600nm}. Dans les deux conditions, la limitation en azote inhibe significativement la production en biosurfactants.

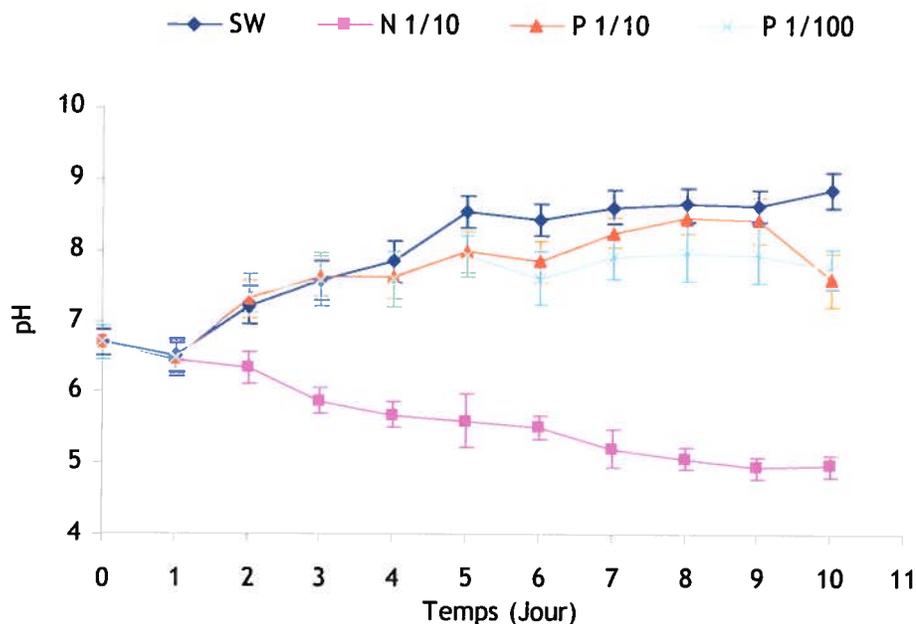


Figure 2.6 -Suivis dans le temps du pH dans les milieux SW et ses variantes limitées en azote (N) ou en phosphate (P).

Au cours de la production des rhamnolipides, le pH a été mesuré au cours du temps. La figure 2.6 montre que le milieu limité en azote s’acidifie jusqu’à un pH 5, alors que les trois autres milieux ont tendance à devenir basique. On remarque qu’il n’y a pas de différence significative entre les milieux limités en phosphate et le milieu SW original.

2.4. L'EFFET DES MODIFICATIONS DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANT

L'optimisation de la production des rhamnolipides dans le milieu minimal SW (Déziel *et al.*, 1996), consistait soit en modifiant les sources de carbone et d'azote, soit en modifiant les concentrations en azote et/ou en phosphate de la même manière que l'apport en fer doit être limité pour stimuler la production (Déziel *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2007). Tous ces paramètres ont été choisis parce qu'ils sont reconnus pour avoir une influence sur le taux de production des rhamnolipides (Guerra-Santos, Käppeli et Fiechter, 1986, Desai et Banat, 1997 ; Lang et Wullbrandt, 1999 ; Nitschke, Costa et Contiero, 2005).

2.4.1. L'effet des sources de carbone et d'azote

Sur les quatre sources de carbone testées (glucose, citrate, éthanol et glutamate) en plus du mannitol présent dans le milieu SW d'origine, seuls le glucose et l'éthanol ont induit une production de rhamnolipides, mais aucun n'a pu augmenter la quantité de rhamnolipides produits (Fig. 2.2 et 2.3) par rapport au milieu d'origine. En fin de compte c'est dans le milieu SW que la production de rhamnolipides reste la plus performante. L'éthanol a déjà été testé comme source de carbone (Hori, Marsudi et Unno, 2002 ; Chen *et al.*, 2007), mais ce n'est que dans les conditions de fermentation dans un bioréacteur que Matsufuji, Nakata et Yoshimoto (1997) ont pu produire une grande quantité de rhamnolipides (jusqu'à 32 g/L). Bien que Robert *et al.* (1989) aient déjà observé que le glucose générât une meilleure production que le mannitol en milieu minimal, nos résultats ont démontré le contraire.

Cependant les différentes sources de carbone ont quand même eu un effet sur la composition des différentes familles de rhamnolipides. En effet, même si la production en biosurfactants est faible en présence d'éthanol (Fig. 2.3-A), le composé majoritairement produit est le dilipide C₁₀C₁₀ (150 ppm en 4 jours), contrairement aux autres milieux où c'est le di-rhamnolipide C₁₀C₁₀ qui est produit majoritairement. C'est la première fois qu'une production de dilipide plus importante que celle des rhamnolipides ait été observée dans nos laboratoires. Quant au glucose, il stimule légèrement la production des mono-rhamnolipides mais sans augmenter la production des di-rhamnolipides (Fig. 2.2-B). En fait, les mono-rhamnolipides ont déjà été observés comme étant les biosurfactants majoritairement produits (Arino, Marchal et Vandecasteele, 1996 ; Sim, Ward et Li, 1997).

Le glutamate a été choisi comme source d'azote alternative car il correspond à un intermédiaire stratégique dans le processus d'assimilation de l'azote (Janssen *et al.* 1980). De plus il a déjà été établi que *P. aeruginosa* était capable d'utiliser cet acide aminé comme source d'azote (Mulligan et Gibbs 1989; Somerville, Mikoryak C.A. et Reitzer, 1999). Étant donné sa composition chimique ($C_5H_9NO_4$), il a aussi été testé comme source de carbone dans cette étude. Cependant malgré une forte croissance bactérienne observée après 3 jours (13.73 ± 1.76 à DO_{600nm}), le glutamate inhibe la production de rhamnolipides. Lorsque le glutamate est utilisé comme source de carbone il n'en reste pas moins une source d'azote qui vient s'ajouter au nitrate déjà présent dans le milieu original. Bien que l'apport en carbone respecte l'apport initial du milieu SW, celui en azote se retrouve excédentaire. Or, de nombreuses études ont déjà mis en évidence que plus l'apport en azote est limité, plus la production de rhamnolipides augmente et inversement (Guerra-Santos, Käppeli O. et Fiechter, 1984 ; Mulligan et Gibbs 1989 ; Santa Anna *et al.* 2002 ; Abalos *et al.* 2002 ; Haba *et al.* 2000). De plus, cet excès d'azote crée un débalancement du quotient C/N dans le milieu. Initialement, dans le milieu SW le quotient C/N est de 16/1. Après avoir ajouté le glutamate comme source de carbone, ce quotient est de 4/1. Ainsi nos résultats vont dans le sens des travaux de Guerra-Santos Käppeli et Fiechter (1984 ; 1986), qui observent une production optimale de rhamnolipides lorsque les quotients C/N sont entre 16/1 et 18/1, et aucune production à partir du moment où le milieu n'est plus considéré comme étant limité en azote. Cependant le quotient optimal reste spécifique à chaque souche de *P. aeruginosa* étudiée. En effet d'autres études ont déjà établi des quotients C/N optimaux pour la production de rhamnolipides à des valeurs beaucoup plus ou moins élevées (Haba *et al.* 2000 ; Santa Anna *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2007).

On suppose que lorsque que le milieu est limité en azote, la synthèse des protéines est ralentie pour favoriser les voies de biosynthèses des hydrates de carbone du métabolisme cellulaire primaire et secondaire dont les rhamnolipides (Mulligan et Gibbs 1989 ; Arino, Marchal R. et Vandecasteele, 1996 ; Abalos *et al.* 2002). Inversement, un excès d'azote entraîne une baisse de la synthèse de ces métabolites pour favoriser la croissance bactérienne. Il existe donc une corrélation entre l'apport limité en azote, le quotient C/N et la production de biosurfactants. D'ailleurs, une autre des stratégies employées pour stimuler la production des rhamnolipides a été de réduire d'un facteur 10 l'apport en azote par le nitrate de sodium (Tab. 2.1). Mais cette tentative n'a pas été concluante non plus. Cela pourrait s'expliquer, d'une part, par la faible croissance bactérienne observée (Fig. 2.4), et

d'autre part, par la baisse du pH mesurée dans le milieu de culture au cours du temps (Fig. 2.6). En effet, après 3 jours le pH est descendu sous la barre de 6 jusqu'à 5, ce qui rejoint des résultats précédemment observés (Syldatk *et al.*, 1985 ; Arino, Marchal R. et Vandecasteele, 1996; Mata-Sandoval, Karns et Torrents, 2001) et qui estimaient que la production de rhamnolipides restait stable entre les pH 6 et 7 mais qu'elle diminuait à des pH plus et moins élevés.

Quant au citrate, non seulement il ralentit la croissance bactérienne (Fig. 2.1), mais en plus il inhibe aussi la production de rhamnolipides. Le citrate et le glutamate sont donc deux très mauvais candidats pour tenter d'améliorer la production des rhamnolipides.

2.4.2. L'effet du phosphate

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer la production en rhamnolipides, la concentration en phosphate est un des éléments nutritionnels limitants (Guerra-Santos, Käppeli et Fiechter, 1984 ; Mulligan, Mahmoudides et Gibbs, 1989). Dans un premier temps, une diminution d'un facteur 10 de la concentration en phosphate dans le milieu SW n'a eu aucun effet significatif, ni sur la croissance bactérienne (Fig. 2.4), ni sur la production en biosurfactants (Fig. 2.5). Ceci indiquait que déjà dans le milieu SW d'origine il devait y avoir un excès de phosphate. Ce pourquoi dans un deuxième temps la concentration en phosphate a été réduite d'un facteur 100 (Tab. 2.1). Pour la première fois dans cette étude, la production en rhamnolipides s'est retrouvée améliorée (Fig. 2.5). En effet, en limitant l'apport en phosphate, un meilleur rendement de production cellulaire a été observé. Ainsi, malgré une faible croissance bactérienne, c'est le milieu limité en phosphate d'un facteur 100 qui produit le plus de rhamnolipides par cellule (Fig. 2.5-B). En milieu limité en phosphate, Bazire *et al.* (2005) observaient des rendements similaires. De même, en conditions dénitrifiantes, limiter l'apport en phosphate se révèle être très rentable, ainsi Chayabutra, Wu et Ju (2001) ont observé une augmentation de la production de rhamnolipides qui était 4 à 5 fois supérieure en comparaison avec une limitation en azote en condition non dénitrifiante.

CHAPITRE 2

Propriétés physico-chimiques des dilipides

3.1 OBJECTIFS

Avant d'initier le projet de recherche en produisant des dilipides par un hôte hétérologue en présence du gène *rhlA*, dans une étude préliminaire, nous avons mis en place un procédé enzymatique original pour produire des dilipides à partir de rhamnolipides. Il s'agissait de trouver une enzyme capable d'hydrolyser de la liaison entre le rhamnose et le dilipide des rhamnolipides. Et c'est la naringinase qui a été utilisée. En effet, c'est une enzyme de *Penicillium decumbens* commercialement disponible qui a des activités α -L-rhamnosidase et β -glycosidase (Fig. 3.1A, Michon *et al.*, 1989 et Zverlov *et al.* 2000). Cependant Trummler *et al.* (2003) ont révélé que dans certaines conditions cette enzyme pouvait aussi avoir une activité β -L-rhamnosidase qui nous intéresse particulièrement (Fig. 3.1B).

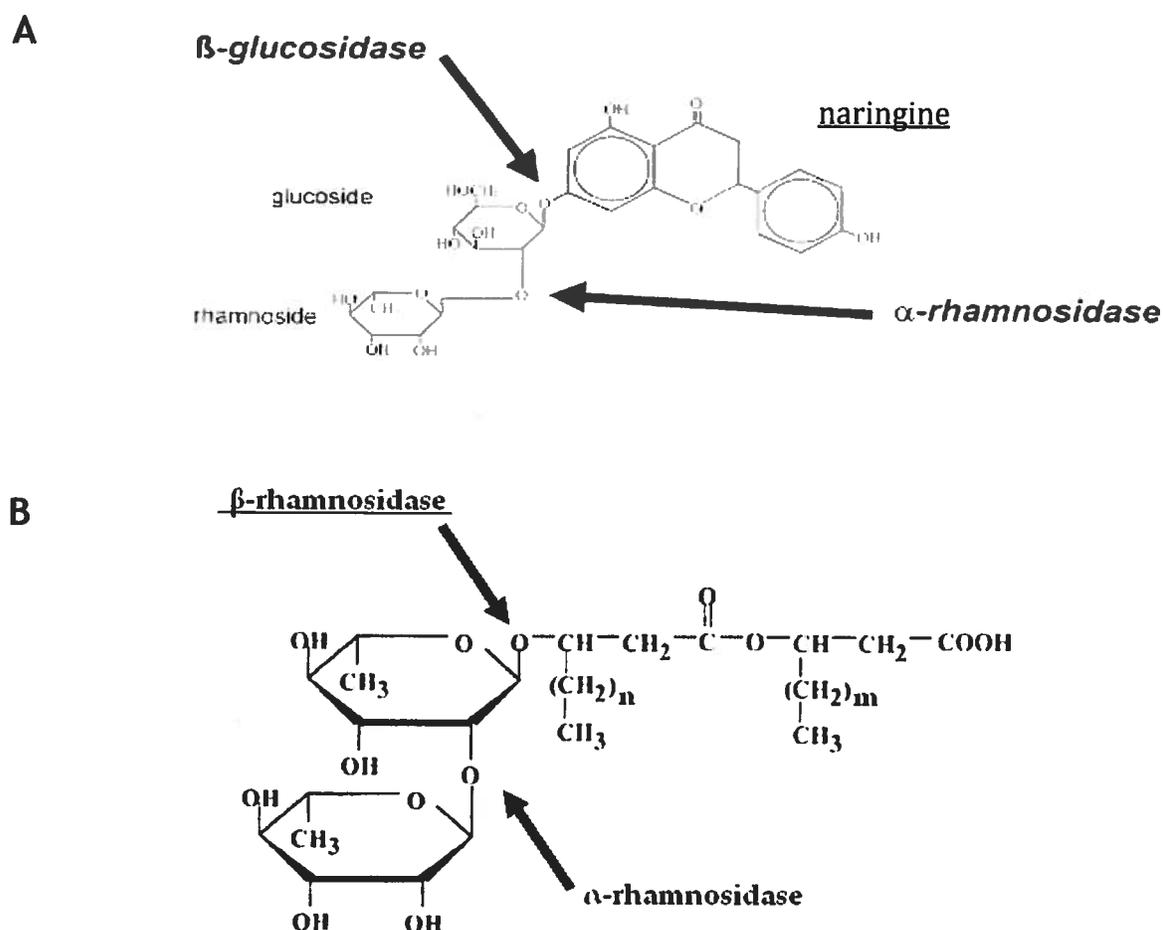


Figure 3.1 A- Les principales activités enzymatiques de la naringinase : α -L-rhamnosidase et β -glycosidase sur la naringine (d'après Zverlov *et al.* 2000). B- L'activité β -rhamnosidase nécessaire à l'hydrolyse des rhamnolipides pour obtenir les HAAs, obtenue dans les conditions présentées par Trummler *et al.* (2003).

C'est donc dans les conditions particulières déterminées par Trummler *et al.* (2003) que les rhamnolipides ont été hydrolysés en dilipides. Une fois complètement purifiés, les dilipides obtenus et les rhamnolipides sont comparés en fonction de leurs propriétés biosurfactantes. Une fois purifiés, nous avons testé les dilipides pour leurs propriétés biosurfactantes en comparaison avec les rhamnolipides. En effet, Déziel *et al.* (2003) mettent en évidence que les dilipides présentent des propriétés biosurfactantes plus intéressantes que celles des rhamnolipides.

Par ce volet du projet, nous avons voulu confirmer ces résultats et les compléter par un test de moussage. En effet, un des inconvénients dans la production industrielle des biosurfactants est la grande production de mousse qui nécessite l'utilisation de produits anti-mousse et donc qui génère des coûts de production supplémentaires. Dans cette étude il était intéressant d'analyser les propriétés tensio-actives des dilipides et leur capacité de moussage.

3.2 METHODOLOGIE

3.2.1 Hydrolyse enzymatique des rhamnolipides pour la production de dilipides

Les rhamnolipides (800 mg) sont resuspendus dans 40 ml d'une solution de 50 mM d'acétate de sodium (pH 4.1). Sous agitation constante à 150 rpm, 400 mg de naringinase sont rajoutés à la solution placée à 37°C. Après 2 h, la solution est placée à 50°C. Dans un premier temps le volume est ajusté à 200 ml avec de l'acétate de sodium à 50 mM à pH 4.1. Après 24 h, 640 mg de naringinase sont ajoutés, dans un volume final de 400 ml, ajusté avec de l'acétate de sodium à 50mM à pH 4.1. La solution reste sous agitation constante à 50°C pendant 96 h après quoi les dilipides produits sont extraits à l'acétate d'éthyle.

Au cours des 96 h, des échantillons de 500 µl sont prélevés régulièrement et conservés à 4°C, afin d'être ultérieurement traités puis analysés. Chaque échantillon est lavé avec un volume équivalent en acétate d'éthyle. La phase organique est transférée dans une bouteille CLHP de 2 ml, puis évaporée sous jet d'azote. L'extrait est resuspendu dans 1 ml d'une solution d'acétate d'ammonium 2 mM contenant 40% d'acétonitrile et 10 ppm d'acide 16-hydroxdécanoïque comme standard interne. Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie en phase liquide (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM).

3.2.2 Extraction des biosurfactants

Dans un premier temps, le mélange réactionnel contenant les biosurfactants est acidifié (pH 2 final) avec du HCl concentré, pour faire précipiter les biosurfactants. Ensuite, elle est transférée dans une ampoule de décantation et soumise à 3 lavages successifs à l'acétate d'éthyle avec un tiers du volume de la phase aqueuse. Les phases organiques sont regroupées, déshydratées avec quelques grammes de sulfate de sodium (Na_2SO_4), puis transférées dans un ballon pour être évaporées à l'évaporateur rotatif dans un bain-marie à 30°C. Le solvant est ensuite complètement éliminé sous vide à l'aide d'une pompe à huile pendant plus de 8 h. Selon les besoins ultérieurs d'expérimentation, l'extrait est resuspendu dans du méthanol ou de l'eau milli-Q à pH basique puis conservé à - 20°C.

3.2.3 Séparation et purification des biosurfactants par chromatographie

Afin d'obtenir des dilipides purs, exempts de toutes traces de rhamnolipides (di-rhamnolipides et/ou mono-rhamnolipides), les composés de l'extrait de biosurfactants sont séparés et purifiés à travers un gel de silice avec un mélange de solvants organiques dont les proportions ont été préalablement optimisées par chromatographie sur couche mince.

3.2.3.1 Chromatographie sur couche mince

Suite à l'extraction à l'acétate d'éthyle, un échantillon est séparé et purifié par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de silice et développées dans un mélange de 10 % dichlorométhane et 90 % acétate d'éthyle. Pour visualiser la séparation des constituants qui composent l'extrait, la plaque de silice est placée sous une longueur d'onde de 254 nm. La plaque de silice contient un indicateur fluorescent, le F254, excitable à cette longueur d'onde. Ainsi, la plaque fluoresce partout à l'exception des endroits où se trouvent les composés organiques tels que les biosurfactants.

3.2.3.2 Chromatographie sur gel de silice

Après que le mélange de solvant organique ait été optimisé pour obtenir une séparation optimale des biosurfactants dans l'échantillon réactionnel extrait à l'acétate d'éthyle, celui-ci est séparé et purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice confectionnée dans une colonne à addition. Dans le fond de la colonne en verre (5.3 x 200 mm), du coton tapé est surmonté d'une couche de sable (5 mm), de 165 mm de gel de silice (200-425 Mesh) et d'une nouvelle couche de sable. La colonne chromatographique ainsi montée est équilibrée avec 50 ml du mélange de 10 % dichlorométhane et 90 % acétate d'éthyle sous une pression de 10 PSI d'azote. L'éluat est ensuite récolté dans 40 tubes à essai de 20 ml en appliquant le même mélange sous une pression continue de 10 PSI.

Une goutte de chaque tube est déposée sur une couche mince de silice quadrillée, puis analysée sous UV. En fonction de l'intensité des zones, les échantillons récoltés dans les tubes sont regroupés, puis évaporés à l'évaporateur rotatif, pour être resuspendus dans du

méthanol. Chaque échantillon est ensuite analysé par CLHP/SM pour déterminer sa composition et sa pureté.

3.2.4 Test de tension de surface : rhamnolipides vs dilipides

La tension de surface (Dynes/cm) des rhamnolipides et des dilipides est mesurée à l'aide d'un tensiomètre de surface Modèle 20 (Fisher) et d'un anneau de 5.960 cm de circonférence. Une dilution sérielle est effectuée à partir 1 500 ppm de chaque biosurfactant, dans un volume final de 20 ml placé dans un bécher de 50 ml (Pyrex). Afin de prévenir la précipitation des biosurfactants, l'eau milli-Q utilisée pour les dilutions est ajustée à pH 11 avec du NaOH. L'anneau est flambé puis rincé à l'eau milli-Q entre chaque dilution. La tension de surface est mesurée en triplicata pour chaque dilution.

3.2.5 Test de moussage : rhamnolipides vs dilipides

La capacité à former de la mousse est évaluée à partir de deux solutions de 250 ppm de rhamnolipides et de dilipides dans un volume final de 2 ml contenu dans un tube à essai de 10 ml. Les solutions sont brassées manuellement pendant 1 minute, puis vortexées pendant 10 secondes. Le volume de mousse formée est évalué à l'aide d'une règle graduée.

3.3 RESULTATS

3.3.1 Hydrolyse enzymatique des rhamnolipides pour la production de dilipides

Après hydrolyse, extraction et purification sur gel de silice, on a obtenu 701,3 mg de dilipides purs à 99.09 % \pm 0.1 sous forme de poudre blanchâtre. Avec quelques traces de mono-rhamnolipides, mais plus du tout de di-rhamnolipides, c'est le dilipide C₁₀C₁₀ qui est le composant majoritaire de l'échantillon (70.05 % \pm 0.67).

3.3.2 Test de tension de surface : rhamnolipides vs dilipides

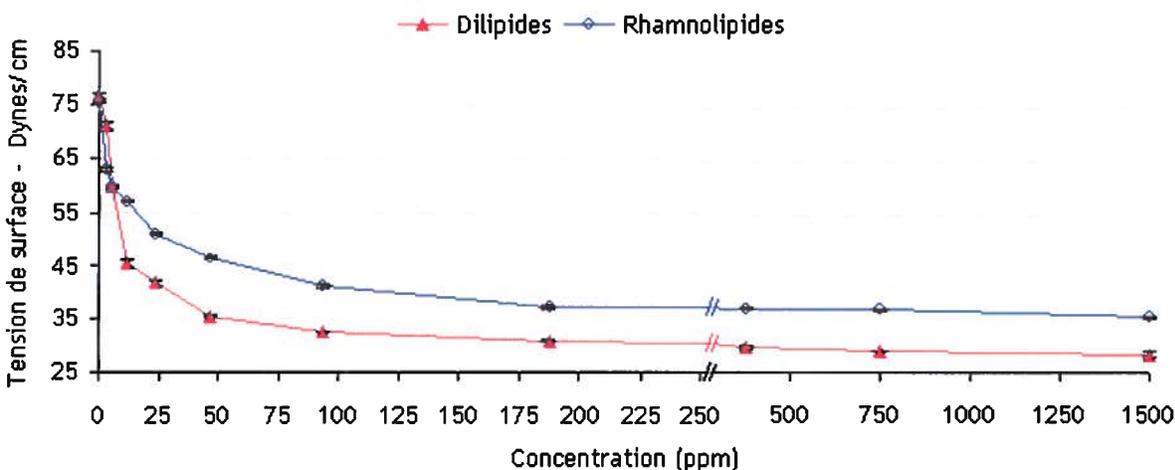


Figure 3.2 -Tension de surface des rhamnolipides et des dilipides en fonction de leurs concentrations dans l'eau. Le mélange de rhamnolipides est extrait d'une solution provenant de la compagnie Jeneil Biosurfactant Co. Le mélange de dilipides est le produit de l'hydrolyse enzymatique des rhamnolipides. Chaque point correspond à une moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard.

La figure 3.2 montre que les dilipides, diminuent la tension de surface à une valeur (28.40 Dynes/cm) nettement inférieure à celle des rhamnolipides (35.33 Dynes/cm). Ceci confirme que les dilipides ont d'excellentes propriétés tensioactives. Ainsi, les dilipides, seraient une nouvelle classe de biosurfactants produite par *P. aeruginosa* en plus des rhamnolipides déjà utilisés dans différentes applications industrielles.

3.3.3 Test de moussage : rhamnolipides vs dilipides

La figure 3.3 démontre que les dilipides produisent significativement moins de mousse que les rhamnolipides. Cette caractéristique peut avoir un intérêt quant à une production et des applications à l'échelle industrielle.



Figure 3.3 - Test de moussage des rhamnolipides et des dilipides. Solutions de 2 ml de 250 ppm de rhamnolipides et de dilipides avant et après brassage pendant 1 minute. La hauteur de la mousse formée par les rhamnolipides (R) est de 6.7 cm alors que celle formée par les dilipides (HAA) est de 0.2 cm.

3.4 LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES DILIPIDES

L'abaissement de la tension de surface jusqu'à 28.40 Dynes/cm (Fig. 3.2) et la faible quantité de mousse formée, même après une forte agitation (Fig. 3.3), font des dilipides, des biosurfactants très compétitifs par rapport aux rhamnolipides. Nos résultats des tests de tension de surface confirment ceux effectués par Déziel *et al.* (2003), mais c'est la première fois que l'on met en évidence que les dilipides forment significativement moins de mousse que les rhamnolipides.

De plus, c'est la première fois que des dilipides sont produits par un procédé biochimique *in vitro* et avec un aussi grand rendement. Bien que très efficace, il est important de noter que cette méthode enzymatique est contraignante. En effet, elle nécessite une grande quantité d'enzyme, une forte température et une durée expérimentale relativement longue.

CHAPITRE 3

Caractérisation fonctionnelle de RhlA

4.1 OBJECTIFS

Dans la voie de biosynthèse des biosurfactants produits par *P. aeruginosa*, sur les trois genes impliqués, rhlABC, seul rhlA n'avait pas encore été caractérisé. Bien que son implication ait été démontrée dans la voie de biosynthèse des dilipides par Déziel *et al.* (2003), la fonction enzymatique de rhlA reste encore à déterminer. C'est ce problème que nous avons abordé dans ce troisième volet du projet de recherche.

Avec ses 6,3 millions de paires de bases, *P. aeruginosa* a le plus grand génome bactérien à avoir été séquencé (Stover *et al.*, 2000). Mais sur les 5 570 cadres de lecture ouverts (CLOs) répertoriés, seulement 372 (6.7%) ont une fonction qui a été démontrée, tel que pour *rhlB* et *rhlC*. Pour *rhlA*, la caractérisation enzymatique commence avec une analyse préliminaire d'homologie de séquences aminées. Bien qu'aucun domaine fonctionnel n'ait été identifié sur RhlA, sa séquence protéique est identique à 41.48% et similaire à 60.65% avec la séquence protéique de PhaG, identifiée comme une 3-hydroxyacyl-ACP :CoA transférase dans les diverses souches de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. aleovorans*, *P. syringae* et *P. sp.* 61-3). Par son activité, PhaG relie directement la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras avec la voie de biosynthèse des polyhydroxyalcanoates (Rehm *et al.*, 1998). Ainsi, en tenant compte des analyses préliminaires sur les séquences protéiques, on suppose que rhlA pourrait coder pour une ACP:CoA transacylase, qui catalyserait le remplacement du groupement ACP par le CoA sur le 3-hydroxyalcanoyl-ACP. Une deuxième hypothèse serait que RhlA soit capable de dimériser le 3-hydroxyalcanoyl-CoA pour obtenir un 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoyl-CoA. Cependant, lors des analyses de CLHP/SM, seule la forme acide des dilipides (acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïque) est observée (Lépine *et al.*, 2002). Cependant il est vraisemblable que la forme acyl-CoA des dilipides ne soit qu'une forme intermédiaire et que la forme acide soit le produit final de RhlA, qui est ensuite utilisé par RhlB (la rhamnosyltransférase 1).

Afin de vérifier ces hypothèses, il faut suivre et optimiser une série d'étapes expérimentales pour obtenir une protéine recombinante pure, fonctionnelle et prête à être testée dans différentes conditions enzymatiques et aussi l'analyser par spectrométrie de masse afin d'identifier son site actif.

Donc les objectifs de ce volet, qui est le cœur du projet de recherche, sont nombreux. En effet dans un premier temps il faut cloner RhlA pour qu'il puisse être exprimé à la fois chez *P. aeruginosa* pour compléter la mutation $\Delta rhlA$ de la souche UO299 et chez un hôte hétérologue, tel que *Escherichia coli* BL21(DE3) qui est l'un des hôtes les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes (Baneyx, 1999 et Choi et Lee, 2004). Ainsi, en complétant la souche UO299 avec la protéine recombinante, on confirme le rôle indispensable de RhlA dans la production des dilipides (Déziel *et al.* 2003). De plus, en exprimant la protéine recombinante chez *P. aeruginosa*, cela pourrait permettre de déterminer la localisation cellulaire de RhlA qui n'a pas été déterminée jusqu'à maintenant. Une fois la protéine recombinante surexprimée il faut la purifier. La surexpression de la protéine recombinante chez *E. coli* permet d'obtenir une protéine recombinante en suffisamment grande quantité pour être purifiée par colonne ayant une affinité spécifique à l'étiquette insérée en N ou en C-terminal, pour pouvoir ensuite l'analyser et la tester en présence des différents substrats.

Dans le cadre de ce projet, les tests enzymatiques seront analysés de façon qualitative et quantitative par LCHP/SM. De plus, une analyse protéomique plus précise de la protéine recombinante sera effectuée par spectrométrie de masse.

4.2 METHODOLOGIE

4.2.1 Souches bactériennes utilisées dans cette étude

- Les souches de *P. aeruginosa*

La souche environnementale PG201 et son mutant *rhlA*, UO299, ainsi que les souches PAO1 et son mutant PA2871 ont été fournies par le Dr. Eric Déziel (Groupe de microbiologie de l'environnement, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada).

- Les souches d'*E. coli*

Les cellules DH5 α thermo-compétentes, utilisées comme hôte temporaire pour les clonages ont été fournies par Invitrogen. La souche BL21(DE3) a été fournie par le Dr. Richard Villemur.

4.2.1 Les plasmides et les vecteurs d'expression

Le plasmide pUCP18 a été fourni par le Dr. Eric Déziel (Laboratoire du Dr. Rahme, Harvard Medical School, Massachusetts, USA) dans une souche *E. coli* DH5 α . Ce vecteur a la particularité d'être doublement adapté aux systèmes d'expression de *E. coli* et de *P. aeruginosa* (Schweizer 1991 et West *et al.* 1994). Il comprend un promoteur, *Plac*, inductible en présence de X-Gal, un multi-site de clonage dans le cadre de lecture du gène *LacZ* qui code pour la β -galactosidase et un gène *bla* qui confère une résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline chez *P. aeruginosa* et *E. coli*.

Les vecteurs pAPR1, pAPR2 et pAPR3 ont été construits au cours de ce projet à partir du vecteur pUCP18 pour exprimer la protéine recombinante de RhlA avec une queue polyhistidine placée soit en C-terminal, soit en N-terminal.

4.2.2 Manipulation de l'ADN et construction des vecteurs d'expression

4.2.2.1 Extraction et purification de l'ADN bactérien total

L'ADN total de *P. aeruginosa* PG201 a été extrait et purifié selon la méthode de Chen et Kuo (1993). Une préculture de 1.5 ml de PG201 est centrifugée pendant 10 minutes à 13 000 rpm

et le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse (40 mM Tris-acétate pH 7.8, 20 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, 1% SDS). Pour précipiter les protéines et les débris cellulaires, 110 µl de d'une solution de NaCl à 3 M sont ajoutés. La solution devenue visqueuse est centrifugée pendant 10 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube où un volume équivalent de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) est ajouté. La solution est à nouveau centrifugée pendant 3 minutes à la température de la pièce. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, où l'ADN est précipité à l'aide d'éthanol préalablement refroidi à -20°C. La solution est mélangée par inversion manuelle puis conservée pendant 30 minutes à -20°C. L'ADN précipité est culoté par centrifugation puis lavé 2 fois avec une solution d'éthanol à 70 % pour être séché à la température de la pièce. L'ADN est resuspendu dans 50 µl de tampon TE (10 mM Tris pH 7.8, 1 mM EDTA) puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

4.2.2.2 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Après extraction et purification de l'ADN total, une réaction de PCR est effectuée à partir d'amorces spécifiques du gène *rhIA* [Tableau 4.1].

Tableau 4.1 - Séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène *rhIA* et construire les vecteurs d'expression

Vecteur d'expression	amorce 1	amorce 2
pAPR1	5' GATGAATTCGCGATAGCTGTT TGCCTGTTTCG 3'	5' CGTAAGCTTTCAATGATGATGATGATG ATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATG ACGACCTTCGATGGCGTAGCCGATGG CCATCTC 3'
pAPR2	5' GATGAATTCAAAAGCCTGACG CCAGA 3'	5' CGTAAGCTTTCAATGATGATGATGATG ATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATG ACGACCTTCGATGGCGTAGCCGATGG CCATCTC 3'
pAPR3	5' GATGAATTCGGGAGGAGCAGC ATGCATCATCATCATCATATG CGGCGCCAAAGTCTGTTG 3'	5' CGTAAGCTTTCAGGCGTAGCC GATGGCCATCTC 3'

Les amorces contiennent les sites de restriction *EcoRI* en 5' et *HindIII* en 3' en plus d'une queue poly-histidines qui sert d'étiquette de reconnaissance placée en C-terminal ou en N-terminal de la protéine RhIA, selon les besoins de l'expérimentation. Dans un volume final de

50 µl, 0.5 µg d'ADN total est mélangé à 500 µM de dNTPs avec 500 nM de chaque amorce et 2.5 U de la Taq polymérase dans son tampon 1X. Toutes les amplifications PCR sont effectuées sur le GeneAmp 2700 (Applied Bioscience) suivant un programme d'amplification de 30 cycles de 45 secondes pour chaque étape de dénaturation à 95°C, de renaturation à 55°C et d'extension à 72°C, en finissant par 10 minutes d'extension à 72°C. Une vérification des produits de PCR est effectuée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %. Les produits de PCR sont ensuite purifiés avec la trousse QIAquick spin purification (QIAGEN) et conservés à -20°C si nécessaire.

4.2.2.3 Mini-préparation de l'ADN plasmidique

En parallèle, le vecteur de clonage pUCP18 (Schweizer 1991) est extrait de la souche *E. coli* DH5α en utilisant de trousse de préparation QIAprep (QIAGEN) avec quelques modifications. Dans le protocole suivant toutes les centrifugations sont effectuées à 16 000 rpm et à la température de la pièce. Les cellules de DH5α sont centrifugées pendant 10 minutes, puis resuspendues dans 250 µl de solution P1 préalablement additionnée de RNase. Un volume équivalent de la solution P2 est rajouté, puis mélangé par inversion manuelle. Ensuite, 350 µl de la solution P3 sont rajoutés, puis mélangés par inversion manuelle avant d'être centrifugé pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans la colonne de purification, elle-même insérée dans un tube collecteur de 2 ml. Le tube est centrifugé pendant 1 minute et l'éluat est éliminé. La colonne est lavée deux fois avec 500 µl de solution PE, puis centrifugée pendant 1 minute. La colonne est placée dans un nouveau tube collecteur de 1.5 ml, puis 150 µl de la solution EB, préchauffée dans un bain-marie à 70°C, sont rajoutés, et incubé à la température de la pièce pendant 1 minute avant d'être centrifugés. L'éluat, contenant l'ADN plasmidique est ajouté à 15 µl d'une solution d'acétate de sodium à 3 M et 330 µl d'éthanol. Maintenu pendant 1 h à -20°C, la solution est ensuite centrifugée pendant 15 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 50 µl d'eau milli-Q et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. La présence et la pureté de l'échantillon sont vérifiées par électrophorèse en déposant 10 µl de l'échantillon sur un gel d'agarose 1 %.

4.2.2.4 Digestion enzymatique de l'ADN

Les produits de PCR et le vecteur de clonage sont digérés pendant 2 h à 37°C par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* dans un volume final de 42 µl. L'utilisation de la trousse *QIAquick spin purification* (QIAGEN) permet ensuite de purifier les produits de PCR et le vecteur de clonage linéarisé, qui sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

4.2.2.5 Ligation

Les produits de PCR sont ensuite insérés dans le multi-site de clonage de pUCP18 en utilisant 2.5 U d'ADN ligase du phage T4 de la trousse de ligation *pGEM-T Easy vector system I* dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl de tampon de ligation 10X, 1 µl d'ATP 10 mM. Le mélange de ligation est incubé pendant 3 h à 4°C puis toute la nuit à 16°C. Une vérification de l'insertion du gène *rhlA* recombinant dans le vecteur de clonage sera effectuée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %.

4.2.3 Clonages dans *P. aeruginosa* et *E. coli*

Avant de cloner les vecteurs d'expression pAPR1-3 dans les cellules hôtes finales (BL21(DE3) et UO299), ils sont préalablement clonés dans la souche *E. coli* DH5α.

4.2.3.1 Transformation de DH5α par choc thermique

Les bactéries DH5α ont été transformées par choc thermique. Après incubation pendant 30 min en présence de 10 ng de plasmide, 100 µl de cellules DH5α compétentes (Invitrogen) sont incubées dans un bain-marie à 42°C pendant 20 secondes, puis transférées 2 minutes sur la glace afin de laisser pénétrer le plasmide dans la bactérie. La suspension bactérienne est ensuite incubée pendant 90 minutes dans 1.9 ml de milieu SOC (20 g/L de bacto-tryptone, 5g/L de extrait bactérie-levure, NaCl à 8.5 mM, KCl à 2.5 mM, MgCl₂ à 10 mM, glucose à 20 mM, pH 7) à 37°C. Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide, 10 à 100 µl sont étalés sur des géloses de milieu LB contenant 100 µg/ml de carbénicilline et 1 mg/ml de X-Gal, puis incubés à 37°C pendant 12 h pour permettre le développement des colonies. Les colonies blanches obtenues sont mises en cultures dans 3 ml de milieu LB contenant de la

carbénicilline à 100 µg/ml et incubées à 37°C à 250 rpm pendant 8 h. Les vecteurs d'expression sont extraits de la souche DH5α en utilisant la trousse de préparation QIAprep (QIAGEN). Les vecteurs d'expressions obtenus sont ensuite clonés dans la souche UO299 par choc thermique ou dans la souche BL21(DE3) par électroporation.

4.2.3.2 Transformation de *P. aeruginosa* par choc thermique

Les cellules de la souche UO299 sont préparées pour être compétentes au choc thermique selon le protocole de Irani et Rowe (1997). Une culture de la souche UO299 dans 50 ml de milieu LB, est incubée à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0.6. Les cellules sont laissées sur la glace pendant 10 minutes, puis centrifugées à 16 000 rpm à 4°C pendant 10 min. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution de $MgCl_2$ à 150 mM préalablement refroidi. Les cellules sont laissées sur la glace pendant 1 h, puis centrifugées à 16 000 rpm à 4°C pendant 10 min. Ensuite, sur la glace, les cellules sont resuspendues dans 10 ml d'une solution de $MgCl_2$ à 150 mM contenant 15 % de glycérol préalablement refroidi, puis aliquotées en des échantillons de 200 µl. Les cellules sont maintenues à 4°C pendant 12 h puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les cellules thermo-compétentes sont maintenues sur la glace pendant 1 h. Aux 200 µl de cellules thermo-compétentes sont rajoutés 5 µl du vecteur d'expression pAPR2. Après incubation pendant 30 minutes sur la glace, le mélange de transformation est incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 3 minutes, puis laissé sur la glace pendant 5 minutes avant de rajouter 1 ml de milieu LB, qui sera incubé pendant 2 h à 37°C sous agitation constante.

Sur des géloses de 20 ml de milieu LB contenant de la carbénicilline à 300 µg/ml, 10 à 100 µl des cellules transformées sont étalés, puis incubés à 37°C toute une nuit. Les colonies obtenues (toutes blanches) sont mises en cultures dans 3 ml de milieu LB contenant de la carbénicilline à 300 µg/ml et incubées à 37°C à 250 rpm pendant 8 h. Les cellules sont ensuite conservées à -80°C dans des tubes de 2 ml contenant 15 % du volume final en glycérol.

4.2.3.3 Transformation de *E. coli* par électroporation

Une préculture de 1 ml de BL21(DE3) est centrifugée à 16 000 rpm pendant 1 minute, puis lavée deux fois avec une solution de sucrose à 300 mM, préalablement stérilisée. Les cellules

sont ensuite resuspendues dans 200 µl de sucrose à 300 mM et laissées sur la glace pendant 20 minutes. Dans 100 µl de cellules électro-compétentes sont rajoutés 10 ng de vecteur plasmidique. Le mélange réactionnel est laissé sur la glace pendant 20 min avant de subir une électroporation à 2 500 V (Electroporator 2510, Eppendorf). Les cellules sont immédiatement resuspendues dans 2 ml de milieu TSB et incubées à 37°C pendant 1 h sous agitation constante.

Sur des géloses de 20 ml de milieu LB contenant de la carbénicilline à 100 µg/ml et 1mg/ ml de X-Gal, 10 à 100 µl des cellules transformées sont étalés, puis incubés à 37°C toute une nuit. Les colonies blanches obtenues sont mises en cultures dans 3 ml de milieu LB contenant de la carbénicilline à 100 µg/ml et incubées à 37°C à 250 rpm pendant 8 h. Les cellules sont ensuite conservées à -80°C dans des tubes de 2 ml contenant 15 % du volume final en glycérol.

4.2.3.4 Vérification de la présence de l'insert

Toutes les cellules transformées et sélectionnées sur géloses de milieu LB sélectif (contenant 100-300 µg/ml de carbénicilline et/ou 1 mg/ml de X-Gal) sont soumises à une mini-préparation afin d'extraire leur vecteur plasmidique. Pour cela, la trousse de préparation QIAprep (QIAGEN) est utilisée. Ensuite, 2.5 µl des vecteurs obtenus sont linéarisés en utilisant 0.5 µl de l'enzyme EcoRI dans un volume final de 10 µl maintenu à 37°C pendant 2 h. La taille des vecteurs est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

4.2.4 Complémentation de la mutation chez UO299

4.2.4.1 Test de complémentation

Les souches PG201, UO299 et UO299(pAPR2) sont cultivées à 30°C pendant 7 jours et sous agitation constante à 250 rpm, dans 50 ml de milieu SWF contenant, quand nécessaire, de la carbénicilline à 300 µg/ml. Des échantillons de 500 µl sont prélevés régulièrement dans les surnageants de culture, pour analyser et quantifier les rhamnolipides et dilipides produits, par spectrométrie de masse.

Chaque échantillon est centrifugé pendant 10 minutes. Ensuite, un volume équivalent d'une solution de 80 % acétonitrile contenant 4 mM d'acétate d'ammonium et 20 ppm d'acide 16-hydroxydécanoïque (standard interne) est rajouté au surnageant. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

4.2.4.2 Localisation cellulaire de RhlA chez *P. aeruginosa*

La souche UO299(pAPR2) est cultivée pendant 4 jours dans 500 ml de milieu SWF contenant 300 µg/ml de carbénicilline sous agitation constante à 250 rpm à 30°C. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues respectivement dans 250 ml et 10 ml d'un tampon K₂HPO₄ à 50 mM à pH 7.5, après deux centrifugations à 7 000 rpm (rotor JLA-10.5) pendant 20 minutes à 4°C. La suspension cellulaire est maintenue sur la glace puis soumise trois fois à 18 000 PSI avec une presse de French qui a été préalablement refroidie à 4°C. Après centrifugation à 12 000 rpm (rotor JA25.50) pendant 20 minutes à 4°C, les débris cellulaires sont éliminés et le surnageant est soumis à une ultracentrifugation de 40 000 rpm (rotor 70Ti) pendant 90 minutes à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction cytoplasmique, est conservé à -20°C, alors que le culot, contenant les protéines membranaires, est resuspendu dans 10 ml de tampon K₂HPO₄ à 50 mM à pH 7.5, contenant 1% de Triton et 20% de glycérol, puis maintenue sous agitation constante sur la glace pendant 45 minutes. Après une ultracentrifugation à 40 000 rpm (rotor 70Ti) pendant 90 minutes à 4°C, le surnageant correspondant à la fraction à la fraction des protéines membranaires solubilisées, est conservé à -20°C. Un échantillon de 50 µl de chaque fraction cellulaire est prélevé pour être analysé sur un gel de polyacrylamide dénaturant puis ensuite par immunobuvardage de type Western.

4.2.5 Production de dilipides par BL21(DE3)

4.2.5.1 Surexpression de la protéine recombinante

La surexpression de la protéine recombinante dans les deux systèmes, BL21(DE3)(pARR1) et BL21(DE3)(pAPR3), est effectuée dans 3 fois 100 ml de milieu LB (1 % (m/v) de Bactotryptone, 0.5 % (m/v) d'extrait de levure et 1 % (m/v) de NaCl) contenant 100 µg/ml de carbénicilline agité à 250 rpm à 37°C pendant 6 h.

Dans le premier système d'expression, de l'IPTG à 1 mM est ajouté lorsque la DO_{600nm} atteint 0.6. Dans le deuxième système d'expression, 200 μ M d'IPTG sont ajoutés toutes les heures pendant 5 h. Les milieux de cultures sont ensuite centrifugés à 5 000 rpm pendant 10 minutes, puis 500 μ l du surnageant de culture sont analysés par spectrométrie de masse couplée à une colonne de chromatographie en phase liquide selon la méthode décrite ultérieurement.

4.2.5.2 Production de dilipides marqués au ^{13}C

La souche BL21(DE3)(pAPR3) est inoculée dans 15 ml de milieu minimal M9 (11.5 g/L de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4Cl , du $MgSO_4$ à 1 mM, du $CaCl_2$ à 1 mM et du $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ à 0.01 mM) avec pour seule source de carbone 0.5% d'acétate doublement marqué au ^{13}C et contenant 100 μ g/ml de carbénicilline. Incubée à 37°C sous agitation à 250 rpm pendant 48h, la culture est ensuite centrifugée à 5 000 rpm à 4°C. Les dilipides produits sont analysés par spectrométrie de masse couplée à une colonne de chromatographie en phase liquide. Le culot est resuspendu dans 1.5 ml de tampon Tris à 50 mM et $MgCl_2$ à 50mM (pH 8.0) puis est placé sur la glace puis les cellules sont lysées par ultrasonification (3 fois 30 secondes) en utilisant la sonde HS-419 sur l'Ultrasonic Processor (Vibronics, Pvt, Ltd). Les débris cellulaires sont éliminés après centrifugation à 18 000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant un extrait cellulaire est aliquoté en échantillons de 200 μ l utilisés ultérieurement pour les tests enzymatiques.

4.2.6 Production de rhamnolipides par le mutant PA2871 « tesB like »

La souche PAO1 et son mutant PA2871 sont cultivés dans 50 ml de milieu LB à 37°C et à 250 rpm jusqu'à une DO_{600nm} de 6.0. Un échantillon de 1 ml est prélevé dans chaque culture pour analyser la production de rhamnolipides dans le surnageant de culture. Les échantillons sont centrifugés à 16 000 rpm pendant 10 min, puis 500 μ l du surnageant sont mélangés à un volume équivalent d'une solution d'acétonitrile à 60 % contenant 4 mM d'acétate d'ammonium et 20 ppm d'acide 16-hydroxydécanoïque. Si nécessaire, les échantillons peuvent être conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

4.2.7 Purification de RhIA recombinante

4.2.7.1 Préparation de l'échantillon

Les 3 cultures de 100 ml sont regroupées puis centrifugées à 5 000 rpm à 4°C (Beckman Averti™ centrifuge J 25, rotor F10BCI FiberLite, Piramoon technologies, Inc.). Selon les besoins de l'expérience, le culot de cellules est resuspendu, soit dans 10 ml de tampon de lyse dénaturant (Urée à 8 M, Na₂HPO₄ à 30 mM, NaCl à 300 mM et imidazole à 10mM), soit dans 10 ml de tampon de lyse non dénaturant (Tris pH 8.0, MgCl₂ à 50mM). A ce stade de l'expérience, l'échantillon peut être conservé à -20°C, cependant il est nécessaire de rajouter 15% de glycérol lorsque des conditions natives sont utilisées.

L'échantillon est placé sur la glace puis les cellules sont lysées par ultrasonification (3 fois 30 secondes) en utilisant la sonde HS-419 sur un Ultrasonic Processor (model 600-Watt). Les débris cellulaires sont éliminés après centrifugation à 18 000 rpm à 4°C (Beckman Averti™ centrifuge J 25, rotor Beckman JA 25.50). Le surnageant est soumis à une ultracentrifugation à 40 000 rpm à 4°C (Beckman Model L5-65, rotor Beckman 75Ti) pendant 45 min afin d'obtenir une fraction cytoplasmique. Les membranes et les protéines membranaires se retrouvent dans le culot.

La protéine recombinante est ensuite isolée sur une colonne d'affinité au nickel selon la méthode IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography). Une vérification de la pureté de la protéine recombinante sera effectuée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) tel que décrit à la section méthodologie 4.2.15.

4.2.7.2 Préparation de colonne de chromatographie d'affinité au nickel

Une colonne Histrap™ (GE Healthcare) de 1ml est utilisée pour la purification de la protéine recombinante. Préalablement au protocole de purification, la colonne doit être chargée en nickel, lavée puis équilibrée. Toutes les solutions sont filtrées (0.2 µm) et appliquées sur la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 2 ml par minute.

Dans un premier temps, la colonne est lavée avec 5 ml d'eau milli-Q, puis à l'aide d'une seringue, 500 µl de NiSO₄ à 100 mM sont rajoutés, suivis d'un second lavage de 5 ml d'eau milli-Q. Une fois la colonne chargée, elle est équilibrée avec 10 ml de tampon sodium phosphate à 20 mM, de NaCl à 500 mM, d'imidazole à 10 mM et contenant ou pas de l'urée à 8 M, selon les besoins de l'expérience.

4.2.7.3 Purification de la protéine recombinante par gradient d'imidazole

A l'aide de la pompe péristaltique (2 ml / minute), la fraction cytoplasmique est passée sur la colonne de nickel équilibrée et suivie d'un lavage avec 10 ml de la solution d'équilibration de la colonne. Les protéines non spécifiquement attachées à la colonne sont éluées avec 50 ml de tampon sodium phosphate à 20 mM, de NaCl à 500 mM, d'imidazole à 50 mM (contenant ou pas de l'urée à 8 M). La protéine recombinante est éluée avec 4 ml de tampon sodium phosphate à 20 mM, de NaCl à 500 mM, d'imidazole à 250 mM (contenant ou pas de l'urée à 8 M). Pour chaque concentration d'imidazole, un échantillon de 50 µl est prélevé pour analyse par électrophorèse en gel polyacrylamide en présence de SDS. Le reste des échantillons est conservé à -20°C sinon utilisé immédiatement pour des tests enzymatiques.

4.2.8 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

La purification des protéines est vérifiée par électrophorèse (BIORAD Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell) dans un gel de séparation de polyacrylamide de 10 % en condition dénaturante (5 ml d'acrylamide/bis 30 %/2.67 %, 6 ml d'eau Milli-Q, 3.25 ml de Tris-HCl pH 8.8, 150 µl de SDS 10 %, 75 µl d'ammonium persulfate 10 % et 7.5 µl de TEMED). Les échantillons de protéines (50µl) sont préalablement mélangés au tampon de charge (12 µl) (2 ml de Tris-HCl à 1 M pH 6.8, 3.2 ml de glycérol, 1.6 ml de B-mercaptoethanol, 0.64 g de SDS, du bleu de bromophénol et 1.2 ml d'eau milli-Q) puis placés dans un bain-marie bouillant pendant 1 minute avant d'être centrifugés à 16 000 rpm pendant 2 minutes. Un standard de protéines de différents poids moléculaires est aussi appliqué. Les échantillons dénaturés (30µl) sont déposés dans les puits du gel de concentration de polyacrylamide 4% (1.3 ml d'acrylamide/bis 30 %/2.67 %, 6.1 ml d'eau Milli-Q, 2.5 ml de Tris-HCl pH 6.8, 100 µl de SDS 10 %, 50 µl d'ammonium persulfate 10 % et 10 µl de TEMED). Après avoir immergé les gels dans le tampon de migration (5 g de Tris, 14.4 g de glycine, 1 g de SDS et ajusté le volume final à 1

L avec de l'eau milli-Q), les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire pendant 45 minutes sous un voltage de 200 V.

Les échantillons sont analysés en duplicata sur des gels séparés. Après migration, les protéines sont fixées et colorées dans une solution de coloration (0.25 % de Bleu de Coomassie R-250, 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique) pendant 40 minutes sous agitation constante. Le gel est ensuite décoloré (40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique) pendant 2 h, puis conservé dans une solution d'acide acétique 5%. Pour une plus longue conservation du gel, celui-ci est incubé dans une solution de séchage (40 % de méthanol, 3 % de glycérol) à la température de la pièce durant 2 h et séché sur des papiers buvards. L'autre gel est réservé pour l'immunobuvardage de type Western.

4.2.9 Immunobuvardage de type Western

Le transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (Millipore) se fait en condition immergée dans le système BIORAD *trans blot cell*. Dans un premier temps la membrane de PVDF est plongée dans du méthanol (100 %). Ensuite le gel de protéines, la membrane de PVDF, ainsi que les feuilles de papier Whatman N°1 et les feuilles en mousse sont équilibrés dans le tampon de transfert Towbin (Tris à 25 mM, Glycine à 192 mM, pH 8.3) à 4°C pendant 30 minutes. Le gel contenant les protéines est placé sur la membrane entre deux couches de feuilles de mousse et de papier Whatman N°1, le tout disposé dans une cassette de transfert plongée dans la cuve de l'appareil de transfert contenant le tampon de transfert Towbin et un bloc de glace. Afin d'initier le transfert des protéines, une tension de 100 V est appliquée pendant 1 h. sous agitation constante du tampon de transfert. La membrane est conservée à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure.

4.2.10 Immunodétection et révélation par électroluminescence

Toutes les étapes suivantes se font à la température ambiante sous agitation constante, dans un volume final de 10 ml pour chaque solution d'incubation utilisée.

Si nécessaire la membrane est réhydratée pendant 10 minutes dans 10 ml de PBS (8 g/L de NaCl, 0.2 g/L de KCl, 1.15 g/L de Na₂HPO₄.7H₂O et 0.2 g/L de KH₂PO₄). La membrane est

ensuite incubée dans une solution de saturation (lait écrémé 3 %) pendant 1 h. Après deux lavages successifs de 5 minutes dans du PBS-T (solution de PBS contenant 1 % de Tween-20), la membrane est mise en présence des anticorps primaires anti-poly-histidines (dilués 1/3 000) dans du lait écrémé 1.5 %. Après deux nouveaux lavages successifs de 5 minutes dans du PBS-T, la membrane est mise en présence des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la peroxydase (dilués 1/1 000) dans du lait écrémé 1.5 %. Pour finir, la membrane subit une série de trois lavages successifs de 10 minutes dans du PBS-T.

La révélation des anticorps se fait par électrochimiluminescence en utilisant la trousse de détection ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare). La membrane est égouttée sur du papier absorbant, puis déposée avec les protéines exposées vers le haut. La surface de la membrane est ensuite recouverte avec 3 ml de la solution-2 de la trousse de détection. Après quelques minutes, 3 ml de la solution-1 de la trousse de détection sont rajoutés et la membrane est baignée dans le mélange révélateur pendant une minute. La membrane est égouttée puis enveloppée dans un film plastique libéré de toute poche d'air. La membrane plastifiée est déposée dans une cassette autoradiographique. Dans une chambre noire, un film ECL est déposé par dessus pendant quelques secondes. Le film est ensuite développé à l'aide du développeur AFP IMAGING, Mini-Med/90, X-Ray film processor.

4.2.11 Digestion tryptique en gel et extraction des peptides

4.2.11.1 Décoloration

Les bandes de protéines obtenues après électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante et après coloration au Bleu de Coomassie, sont découpées à l'aide d'un scalpel stérile. Placées dans un tube eppendorf de 1.5 ml, les bandes sont décolorées dans 1 ml d'une solution d'acétonitrile à 50 % contenant du NH_4HCO_3 à 50 mM et puis maintenues sous agitation constante à la température de la pièce pendant 12 h. La solution est éliminée puis remplacée par 50 μl d'acétonitrile. Après 15 minutes, le solvant est éliminé.

4.2.11.2 Réduction et alkylation

Les bandes décolorées sont immergées dans 150 µl de NH_4HCO_3 à 100 mM et 10 µl de DTT à 45 mM, puis vortexées et centrifugées pendant 10 secondes avant de les laisser incuber dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes. Une fois refroidis à la température de la pièce, 10 µl d'iodoacétamide à 100 mM sont rajoutés. Le mélange est vortexé, puis centrifugé pendant 10 secondes avant d'être incubé à la température de la pièce pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, la solution est éliminée puis remplacée par 500 µl de NH_4HCO_3 à 100 mM et 500 µl d'acétonitrile. Cela permet de décolorer le gel en laissant agir pendant 15 minutes.

4.2.11.3 Digestion tryptique

La digestion tryptique se fait à partir d'une solution de trypsine à 0.01 µg/ul dans un tampon NH_4HCO_3 à 25 mM (pH 8.5). Pour chaque morceau de gel découpé, 20 µl de la solution enzymatique est ajouté, ce qui équivaut à 0.2 µg de trypsine par bande. Après 15 minutes d'incubation à la température de la pièce, 20 µl de NH_4HCO_3 à 25 mM (pH 8.5) sont rajoutés, puis le mélange réactionnel est placé à 37°C pour toute une nuit.

4.2.11.4 Extraction des peptides

Après centrifugation pendant 10 secondes, le surnageant est placé dans un tube de 500 µl et les bandes contenant les peptides sont incubées à 37°C pendant 30 minutes dans 50 µl d'une solution de 60 % acétonitrile contenant 0.1 % de TFA. Après 5 minutes de sonification à température pièce, le surnageant est rajouté au tube de 500 µl. Une seconde extraction est effectuée avant de concentrer les peptides à l'évaporateur rotatif (eppendorf -speed vacuum) pendant 30 minutes. Les peptides sont resuspendus dans 20 µl d'une solution de TFA à 1 % (préalablement filtrée). L'échantillon est conservé à -20°C jusqu'à son analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem tel que précisé dans la section 4.2.15.

4.2.12 Synthèses

4.2.12.1 3 β -OH-C₁₀-ACP

Dans un premier temps, l'intermédiaire réactif, le 3-hydroxydécanyol-imidazole est synthétisé. Dans une bouteille CLHP en verre de 2 ml, sont ajoutés 3 mg de 1,1'-carbonyldiimidazole et 171 μ l d'acide 3-hydroxydécanoïque à 10.2 mg/ml dans du tétrahydrofurane (THF) anhydre. La bouteille est mise à l'étuve à 70°C pendant 1 h. Ensuite, le mélange réactionnel contenant 1 mole d'ACP pour 2 moles de 3-hydroxydécanyolimidazole est incubé à la température de la pièce pendant 10 minutes, puis analysé par spectrométrie de masse utilisant le Q-Trap LC/MS/MS (Applied Biosystems / MDS Sciex, Concord, ON, Canada), pour confirmer la synthèse du C₁₀-ACP (9 022 Daltons).

4.2.12.2 3 β -OH-C₁₀-CoA

Dans une bouteille CLHP en verre de 2 ml, sont ajoutés 3 mg de 1,1'-carbonyldiimidazole et 171 μ l d'acide 3-hydroxydécanoïque à 10.2 mg/ml dans du THF anhydre. La bouteille est mise à l'étuve à 70°C pendant 1 h. Ensuite, 100 μ l de cette solution sont mélangés à 500 μ l d'une solution aqueuse de coenzyme A (3.75 mg/ml) dans une nouvelle bouteille CLHP en verre de 2 ml. Le mélange réactionnel est laissé à 70°C pendant 1 h. Les traces de THF sont ensuite évaporées sous jet d'azote dans un bain-marie à 37°C. Trois lavages successifs à l'acétate d'éthyle, puis trois autres lavages successifs à l'éther éthylique sont effectués. Les traces d'éther éthylique sont évaporées sous jet d'azote dans un bain-marie à 37°C pendant 40 minutes.

4.2.12.3 3 β -OH-C₈-CoA (racémique)

Dans une bouteille CLHP de 2 ml, sont ajoutés 2.04 mg de 1,1'-carbonyldiimidazole et 100 μ l d'acide 3-hydroxyoctanoïque (sous forme racémique) à 10.2 mg/ml dans du THF anhydre. La bouteille est mise à l'étuve à 70°C pendant 1 h. Ensuite, 100 μ l de cette solution sont mélangés à 250 μ l d'une solution aqueuse de coenzyme A (3.75 mg/ml) dans une nouvelle bouteille CLHP de 2 ml. Le mélange réactionnel est laissé à 70°C pendant 1 h. Les traces de THF sont ensuite évaporées sous jet d'azote dans un bain-marie à 37°C. Trois lavages

successifs à l'acétate d'éthyle, puis trois autres lavages successifs à l'éther éthylique sont effectués. Les traces d'éther éthylique sont évaporées sous jet d'azote dans un bain-marie à 37°C pendant 40 minutes.

4.2.13 Tests enzymatiques

4.2.13.1 Deux sources d'enzyme

Les tests enzymatiques sont effectués avec deux sources d'enzymes. La première étant 100 µl d'une fraction cytoplasmique de BL21(DE3)(pAPR3), la deuxième étant 100 µl d'une fraction d'éluion après une colonne de purification au nickel avec 250 mM d'imidazole. Ces deux sources de RhlA recombinante sont ajoutées à un tampon Tris-HCl de 50 mM, pH 8.0 contenant 10 mM de MgCl₂ et 100 µM de substrat (3β-OH-C₁₀-CoA, 3β-OH-C₁₀-ACP, 3β-OH-C₁₀ et 3β-OH-C₈-CoA) dans un volume final de 2 ml.

4.2.13.2 Analyse des échantillons

Des échantillons de 200 à 300 µl sont prélevés, puis ajoutés dans des bouteilles HPLC de 2 ml. Sont ensuite rajoutés 10 ppm de HHQ-D₄ comme premier standard interne, 400 µl d'acétate d'éthyle et 10 µl de HCl concentré. La solution d'extraction est fortement agitée. Ensuite la phase organique est transférée dans une nouvelle bouteille HPLC de 2 ml, puis elle est évaporée sous jet d'azote dans un bain-marie à 37°C. L'extrait est resuspendu dans un volume équivalent au volume d'échantillonnage avec une solution d'acétonitrile à 30 % contenant 2 mM d'acétate d'ammonium et 10 ppm d'acide 16-hydroxydécanoïque comme deuxième standard interne. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse.

4.2.14 Analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Les rhamnolipides, les dilipides et les substrats synthétisés pour les tests enzymatiques, ont été analysés avec un système de chromatographie liquide à haute performance HP 1100 (Agilent Technologies, Kirkland, Canada) équipé d'un injecteur automatique HP G1313A et

d'une colonne (150 x 4 mm) à phase inverse C8 de type Zorbax (taille particulaire de 5 µm), reliée à un spectromètre de masse à triple quadripoles de type Quattro II (Micromass Canada, Pointe-Claire), équipé d'une interface de nébulisation Z-Spray.

Les composantes des échantillons sont éluées par un gradient eau-acétonitrile contenant une concentration constante d'acétate d'ammonium à 2 mM. La composition initiale du solvant est de 70% d'eau pour 30% d'acétonitrile maintenue pendant 2 minutes. Un changement linéaire du gradient s'effectue sur 10 minutes jusqu'à 100 % d'acétonitrile. Ce solvant est maintenu pendant 4 minutes additionnelles, puis le retour aux conditions initiales se fait en 1 minute peut être maintenues pendant 3 minutes. Le gradient est pompé à travers la colonne à un débit de 400 µl/min et le débit réduit du dixième dans un séparateur en T (Valco. Schenkon, Switzerland). Le volume d'échantillon injecté pour les analyses varie de 20 à 80 µl. Les analyses sont effectuées par électronébulisation en mode négatif. Le voltage du capillaire est de 3 500 V et le voltage du cône à 30 V. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation et de séchage à un débit de 20 et 200 ml/min, respectivement. La température à la source est maintenue à 120°C, alors que celle du gaz d'évaporation est maintenue à 150°C. Le balayage effectué varie de 100 à 1 000 m/z .

La quantification est effectuée en mesurant l'aire sous la courbe des chromatogrammes correspondants aux ions pseudomoléculaires et leurs fragments ainsi que du standard interne. Ce quotient est multiplié par la concentration du standard interne ajouté.

4.2.15 Analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem

Les analyses protéomiques ont été réalisées par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase liquide. Toutes les analyses chromatographiques ont été effectuées par un système nanoCL de type Agilent de série 1100 (Agilent Technologies, Inc., Allemagne). Généralement, 8 µl de l'échantillon à analyser sont injectés dans le système puis séparés par un gradient de solvant A (eau et 0.1 % d'acide formique) et de solvant B (acétonitrile et 0.1 % d'acide formique) via une colonne de garde C18 à phase renversée de type ZORBAX 300 SB (5 x 0.3 mm ; 5 µm de taille particulaire) (Agilent Technologies, Inc.) et une colonne (150 mm x 75 µm ; 3.5 µm de taille particulaire) analytique C18 à phase renversée de type ZORBAX 300 SB (Agilent Technologies, Inc.). Toutes les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées

par un Q-Trap CL/SM/SM (AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instrument, Californie) équipé avec une source de nanonébulisation.

Lors de l'analyse, pour chaque ion pseudomoléculaire détecté, une analyse SM complète est effectuée, suivit systématiquement d'une fragmentation induite par collision avec un gaz (azote) pour faire du SM/SM. L'accumulation de ces données est gérée par le logiciel Analyst version 1.4 (AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instrument, Californie). Le logiciel Mascot Distiller (Matrix Science, Londres, Angleterre) est aussi utilisé pour analyser les ions obtenus par SM et SM/SM (Fig. 4.1). Puis c'est le moteur de recherche Mascot Server (Matrix Science, Londres, Angleterre) qui est utilisé pour associer les spectres de fragmentation des peptides analysés à une banque de donnée permettant ainsi l'identification des protéines.

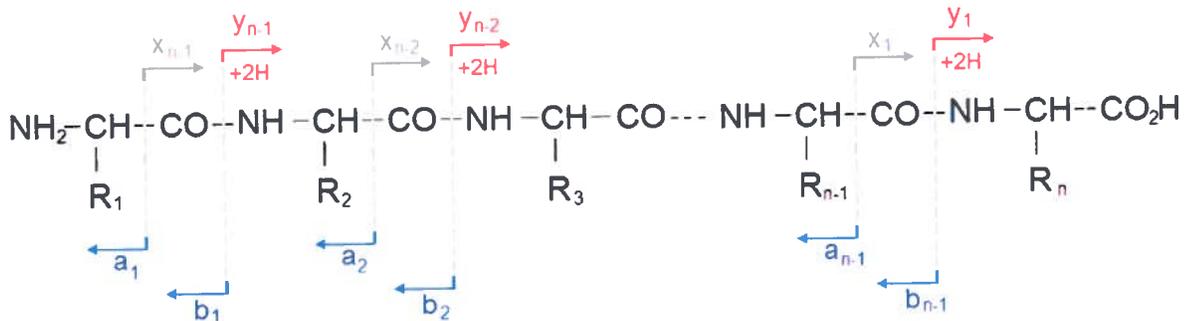


Figure 4.1 - Nomenclature des fragmentations de série a, b, y et x induites par un gaz de collision. La fragmentation de la série a produit des ions aldimines, celles de la série b et x produisent des ions acylium et celle de la série y produit des ions amino. En plus des fragmentations spécifiques à chaque série, les ions peuvent aussi perdre un groupe NH_3 et/ou une molécule l'eau. Les ions y se lisent de droite à gauche, alors que les ions a et b se lisent de gauche à droite.

4.3 RESULTATS

4.3.1 Purification de RhlA recombinante

4.3.1.1 pAPR1 - En conditions dénaturantes

Après avoir cloné le vecteur pAPR1 dans la souche BL21(DE3), une première purification de RhlA a été effectuée en condition native, mais sans aucun succès. Alors une seconde méthode de purification de la protéine recombinante a été tentée mais en condition dénaturante (8 M d'urée), avec une étape subséquente de renaturation de la protéine pour tester ses propriétés enzymatiques.

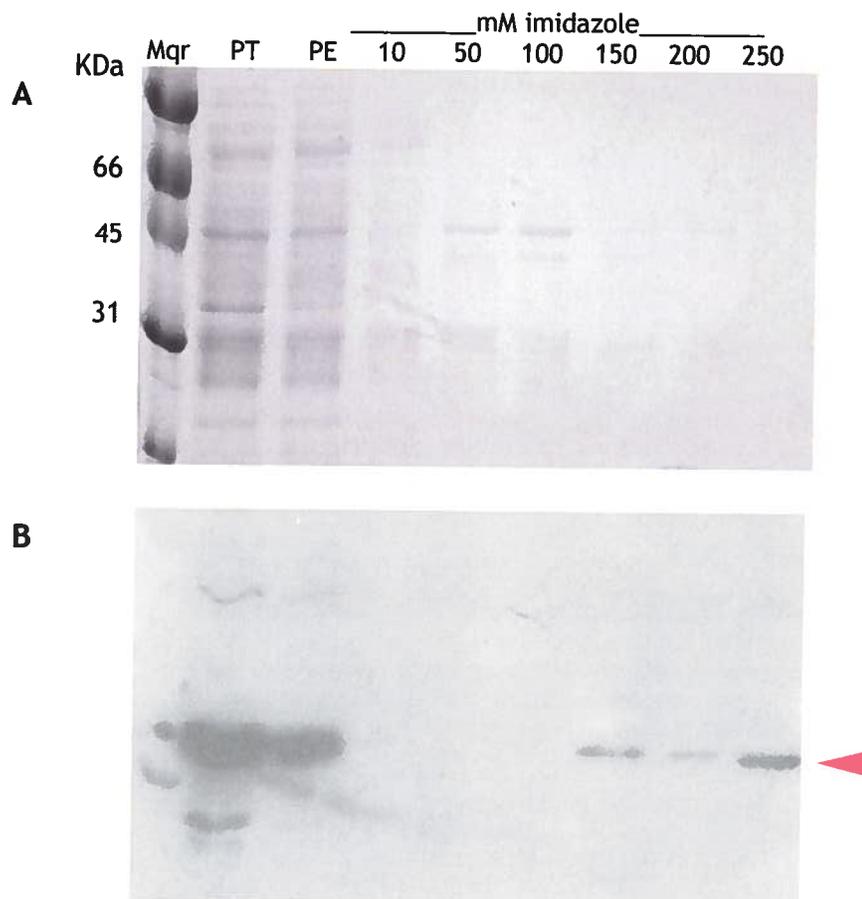


Figure 4.2 - A- Électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) de RhlA recombinante après purification en condition dénaturante sur une colonne d'affinité au nickel. **B -** Immunovubardage de type Western sur une membrane PVDF de RhlA recombinante. La flèche rouge pointe les bandes qui correspondent à la protéine RhlA recombinante de 36 KDa. Mqr, marqueur de poids moléculaire ; PT, protéines totales cytoplasmique ; PE, protéines de la première élution.

Une première expérience a été effectuée avec 100 ml de culture afin de déterminer les conditions optimales de lavages et d'éluion suivant un gradient d'imidazole (10, 50, 100, 150, 200 et 250 mM). Il s'est avéré que la protéine recombinante éluait à partir de 150 mM d'imidazole (Fig. 4.2-B).

Cependant pour augmenter la production de protéine, les expériences suivantes ont été effectuées à partir de 300 ml de culture. C'est ainsi que, tel que montré à la figure 4.3, la méthode de purification de RhlA recombinante a été optimisée en condition dénaturante en présence de 8 M d'urée. La bande éluee à 250 mM a été découpée pour être ultérieurement analysée, séquencée et identifiée par CL/SM (Fig. 4.19). Les analyses ont confirmé qu'il s'agit de RhlA de *P. aeruginosa*.

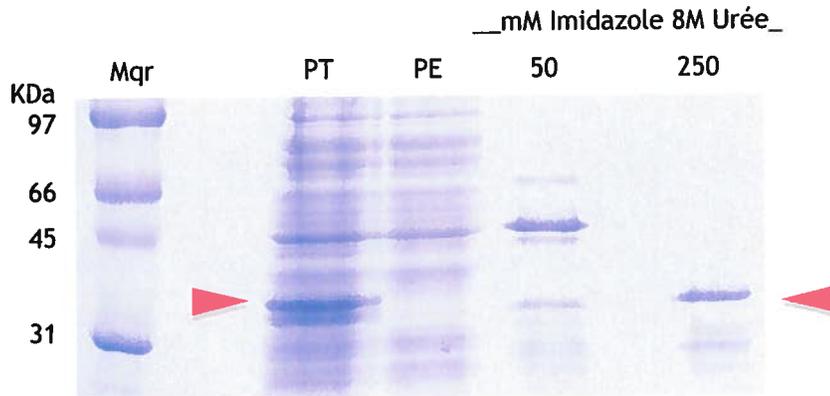


Figure 4.3 - Électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) de RhlA recombinante après purification en condition dénaturante sur une colonne d'affinité au nickel. La flèche rouge pointe les bandes qui correspondent à la protéine RhlA recombinante de 36 kDa. Mqr, marqueur de poids moléculaire ; kDa, kilodaltons ; PT, protéines totales cytoplasmiques ; PE, protéines de la première éluion.

Afin de procéder aux tests enzymatiques, il fallait renaturer la protéine. Ceci a été tenté par diverses techniques de dialyse, de gel de filtration et de dilution, mais sans succès, car à chaque fois la protéine formait des agrégats et précipitait.

4.3.1.2 pAPR3 - En conditions natives

Suite à la construction du vecteur pAPR3 et son introduction dans la souche BL21(DE3), la nouvelle protéine recombinante avec la queue poly-histidines en N-terminal a été purifiée en condition native via une colonne d'affinité au nickel. Bien qu'une production de dilipides ait été détectée dans le milieu de culture, démontrant que la protéine recombinante était fonctionnelle *in vivo*, la première tentative de purification n'a pas fonctionnée. Ceci peut être indicatif d'une protéine recombinante surexprimée mais localisée dans des corps d'inclusions. Afin de pallier à cet obstacle, la méthode de surexpression a été optimisée. D'abord en abaissant la température de surexpression à 25°C au lieu de 37°C, et ensuite en ajoutant progressivement l'IPTG. Le changement de température n'a rien donné de concluant. Par contre, comme le montre la figure 4.4, un ajout progressif de l'IPTG a été efficace pour permettre de retrouver la protéine recombinante dans la fraction cytoplasmique qui a été purifiée en condition native. De plus, la figure 4.4 montre que, même en condition native, la protéine recombinante éluée à 250 mM d'imidazole. La bande élue à 250 mM a été découpée pour être ultérieurement analysée, séquencée et identifiée par CL/SM (Fig. 4.20). Les analyses ont montré que cette bande correspondait à RhIA de *P. aeruginosa*.

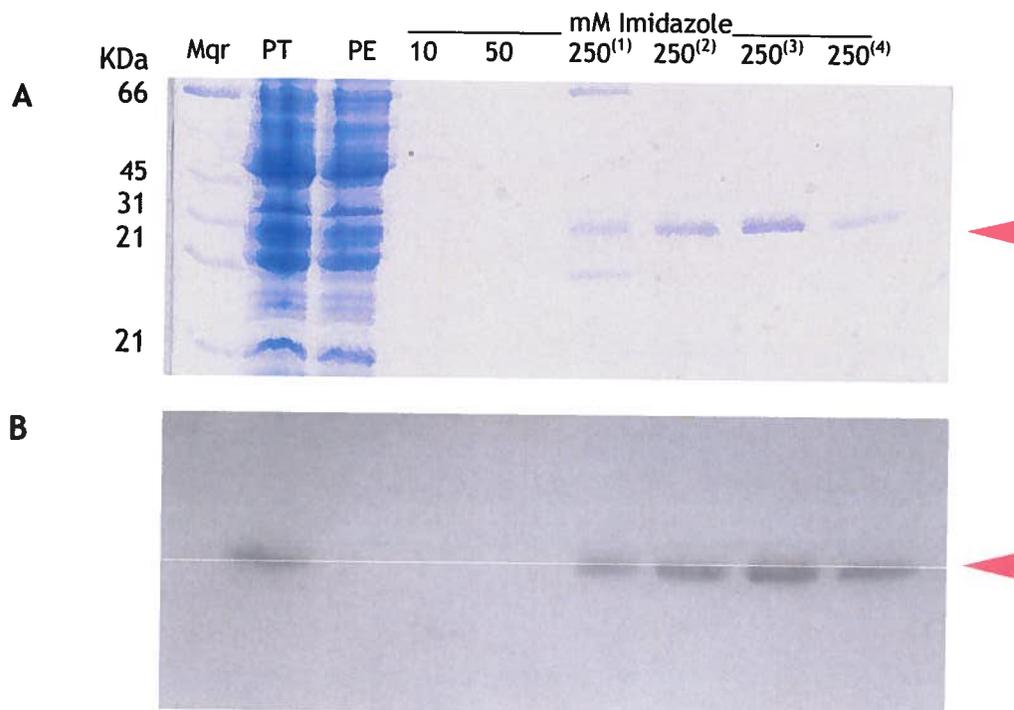


Figure 4.4 - **A**- Électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition native de RhIA recombinante après purification en condition native sur une colonne d'affinité au nickel. **B** - Immunovubardage de type Western sur une membrane PVDF de RhIA recombinante. La flèche rouge pointe la bande qui correspond à la protéine RhIA recombinante de 36 KDa. Mqr, marqueur de poids moléculaire ; KDa, Kilo Dalton ; PT, protéines totales cytoplasmique ; PE, protéines de la première élution.

4.3.2 Complémentation de la souche UO299

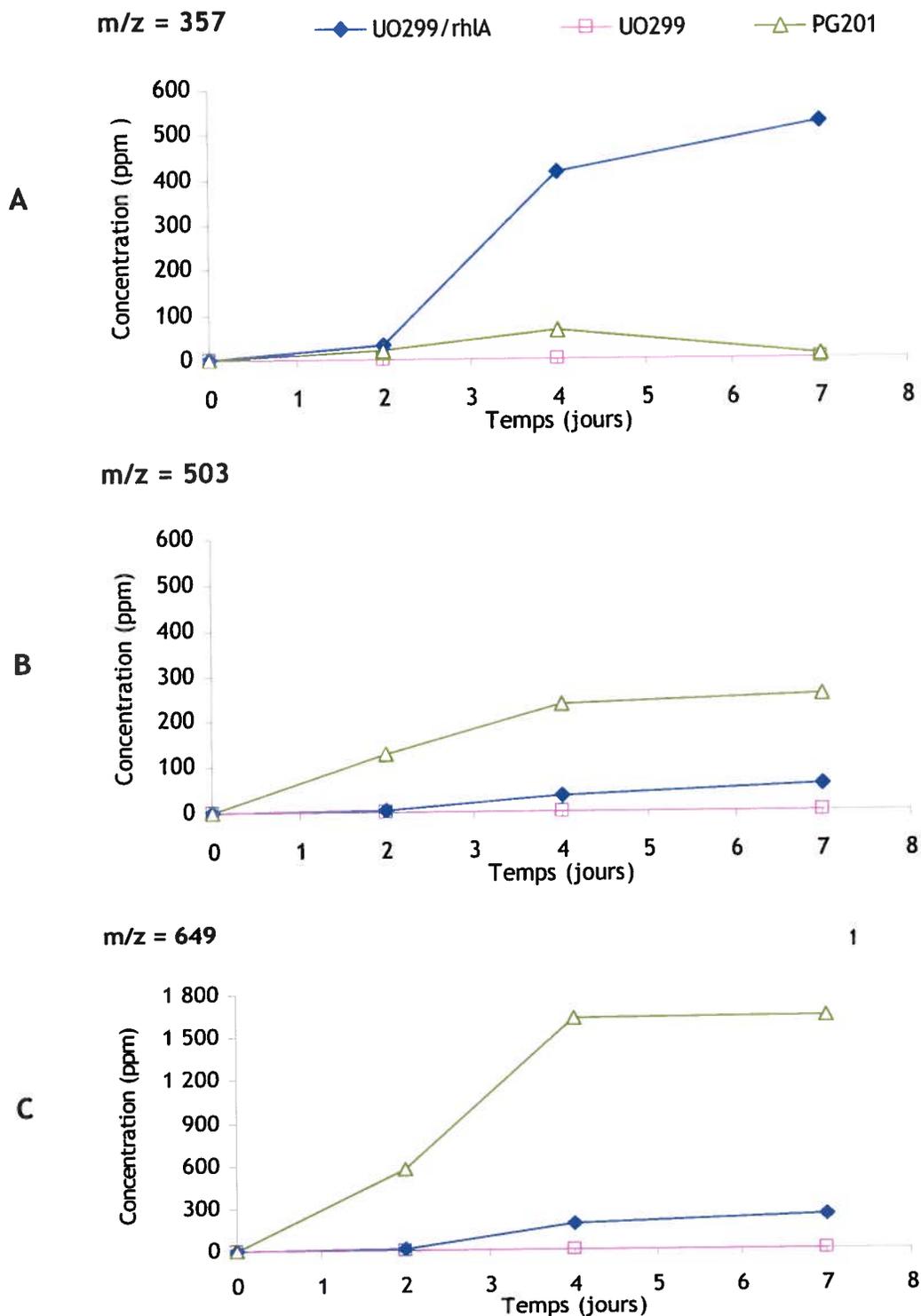


Figure 4.5 -Production des biosurfactants par les souches PG201 (-□-), UO299 (-Δ-) et UO299(pAPR2) (-◆-). A- Suivi de la production du dilipide $C_{10}C_{10}$ ($m/z = 357$). B- Suivi de la production du mono-rhamnolipide $R-C_{10}C_{10}$ ($m/z = 503$). C- Suivi de la production du di-rhamnolipide $RR-C_{10}C_{10}$ ($m/z = 649$).

Afin de mieux caractériser RhlA, il était important de pouvoir aussi l'étudier *in vivo* chez *P. aeruginosa*. Pour cela le vecteur pAPR2 a été spécialement conçu en incluant le promoteur natif de *rhlA* pour que la protéine RhlA recombinante puisse être exprimée et analysée dans son hôte naturel.

Dans un premier temps, la figure 4.5 démontre que le vecteur pAPR2 a permis de compléter la mutation polaire de la souche UO299 sur l'opéron *rhlAB*, permettant ainsi une production de dilipides (523 ppm en 7 jours). Dans un deuxième temps, ces résultats démontrent que RhlA est responsable (et non seulement impliquée) de la production des dilipides chez *P. aeruginosa*. De plus, on constate que lors de la complémentation il y a aussi une légère production de rhamnolipides, indiquant que malgré la mutation *rhlB* est légèrement exprimée et fonctionnelle (Fig. 4.5 B-C).

4.3.3 Complémentation de la souche PAO1 Δ rhlA

Afin de confirmer les résultats ci-dessus, les deux vecteurs d'expression pAPR1 et pAPR2 ont été testés pour compléter la mutation de *rhlA* chez PAO1. La figure 4.6 montre que seule la construction pAPR2 est capable de compléter la mutation.

Afin d'éliminer le doute qui subsistait quant à l'identité du composé qui sortait dans le pic chromatographique à 12.28 minutes chez la souche PAO1 Δ rhlA(pAPR1) (Fig. 4.6), le spectre de masse de ce pic a été étudié. La figure 4.7 confirme que le pic à 12.28 minutes ne correspond pas aux dilipides malgré l'apparition d'un ion pseudomoléculaire à m/z 357. En effet la signature spectrométrique du dilipide $C_{10}C_{10}$ contient l'ion pseudomoléculaire à m/z 357 associé systématiquement à un fragment intense à m/z 187, comme observé sur le spectromètre du pic éluant à 20.90 minutes chez PAO1 Δ rhlA(pAPR2).

Ces résultats confirment le rôle de RhlA dans la production des dilipides chez *P. aeruginosa*, en plus de confirmer que le promoteur de RhlA était indispensable dans le vecteur pAPR2 pour exprimer la protéine recombinante chez *P. aeruginosa*.

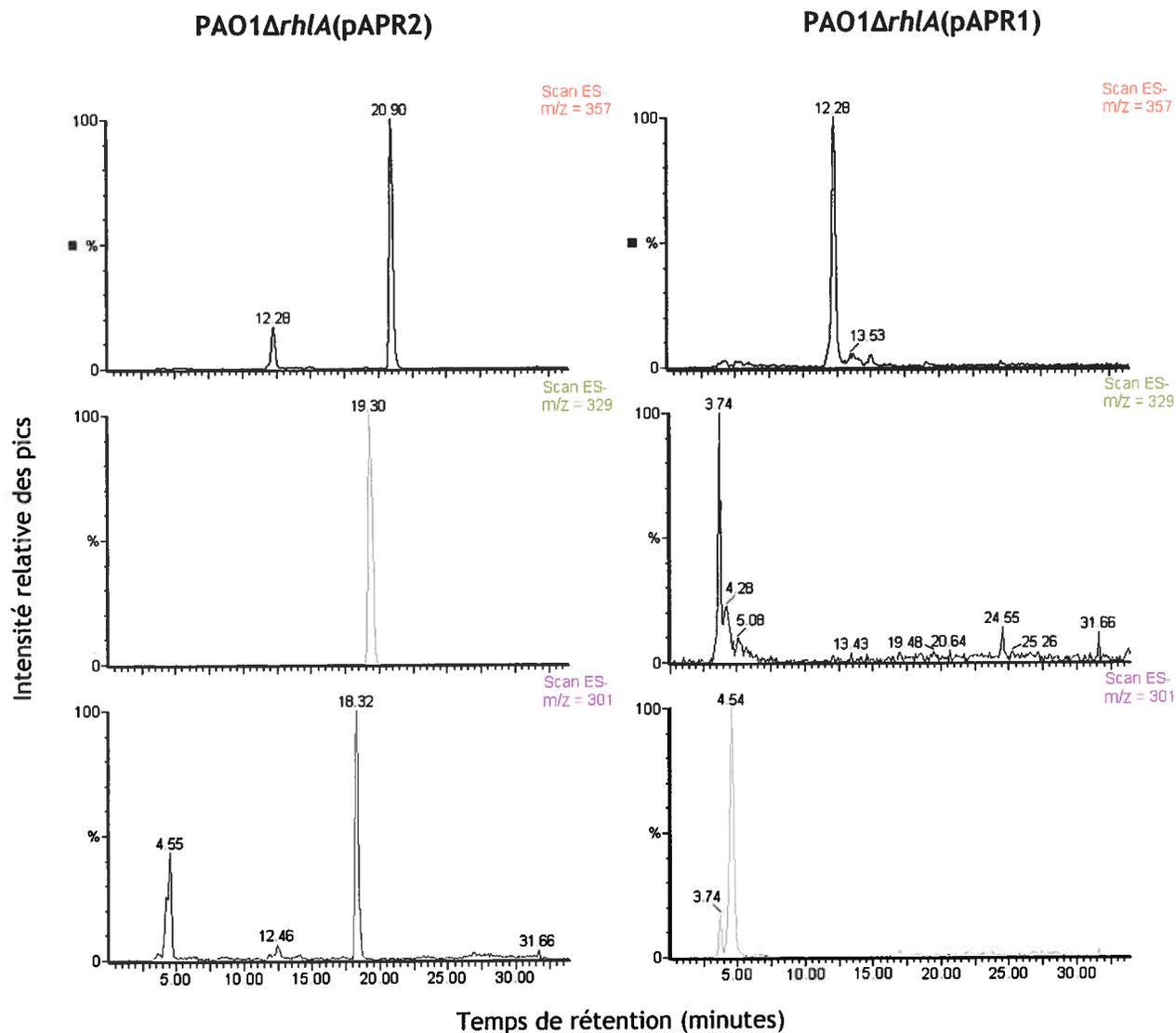


Figure 4.6 Profils chromatographiques des surnageants de culture des souches PAO1ΔrhlA complétées avec les vecteurs pAPR1 et pAPR2. Les pics détectés par CL/SM dans chaque colonne proviennent d'un même échantillon et l'échelle de temps de rétention est la même pour les six profils. Les ions pseudomoléculaires (m/z) 357, 503 et 649 correspondent respectivement aux dilipides C₁₀C₁₀, mono-rhamnolipide R-C₁₀C₁₀ et di-rhamnolipide RR-C₁₀C₁₀.

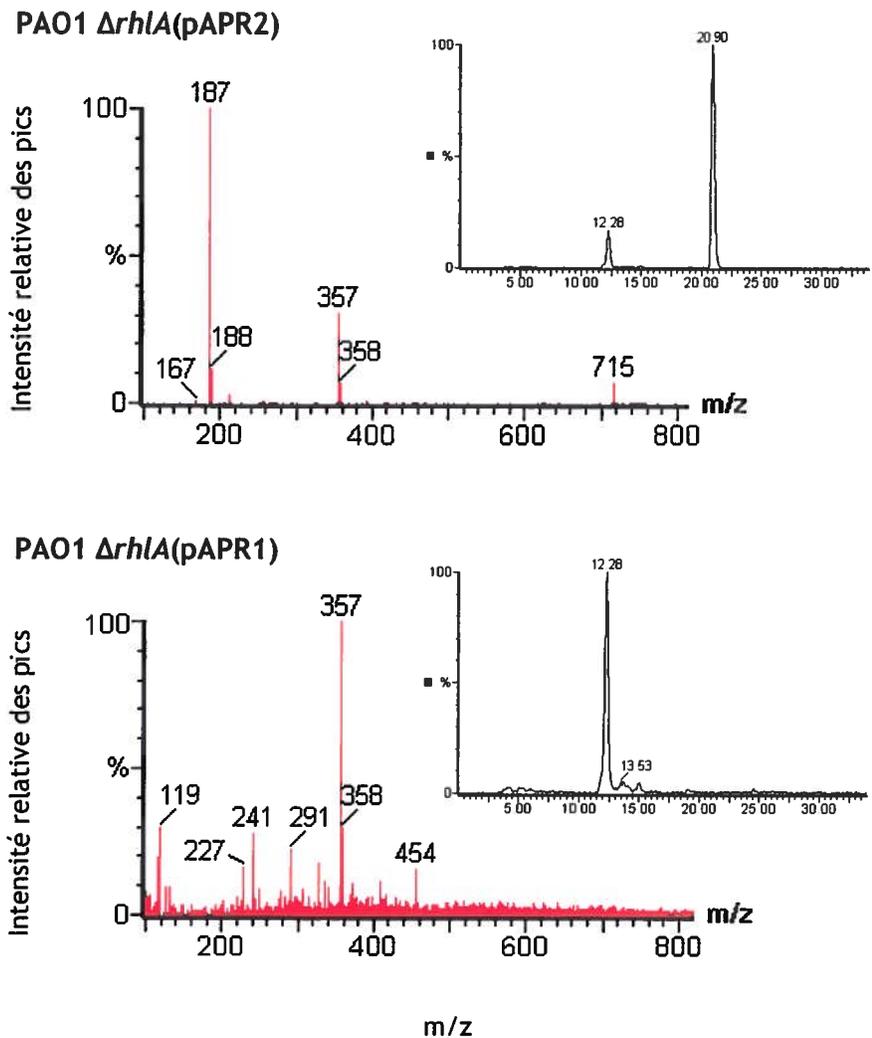


Figure 4.7 - Spectres de masse des pics chromatographique détectés par CL/SM dans le surnageant de PAO1 $\Delta rhIA$ complémenté par pAPR1 et pAPR2.

4.3.4 Localisation cellulaire de RhIA chez *P. aeruginosa*

La complémentation du mutant UO299 a permis de déterminer la localisation cellulaire de RhIA chez *P. aeruginosa*. En effet la figure 4.8 montre bien que la protéine RhIA recombinante, exprimée chez UO299, se trouve dans la fraction cytoplasmique et non dans la fraction membranaire, comme supposé précédemment.

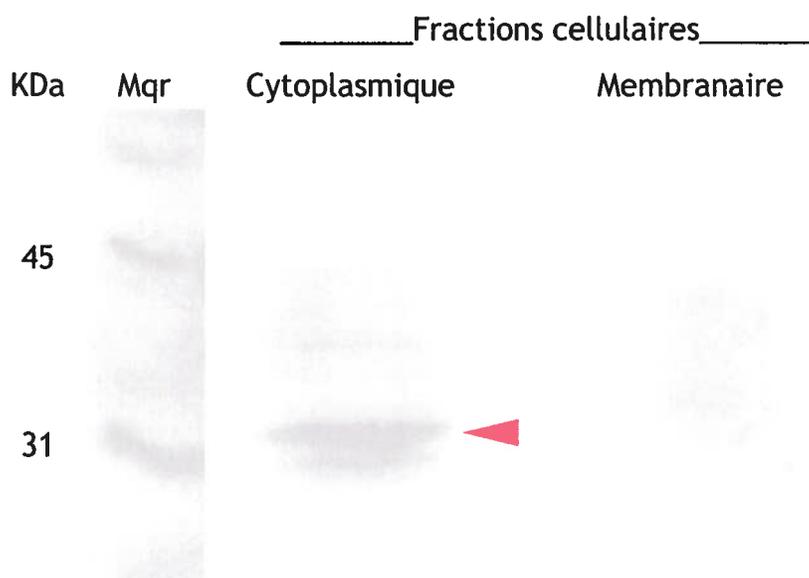


Figure 4.8 - Immunobuvardage de type Western des fractions cellulaires de la souche UO299(pAPR2). Photo de la membrane PVDF révélée par électrochimiluminescence. La flèche rouge pointe la bande qui correspond à la protéine RhIA recombinante de 36 KDa. Mqr, marqueur de poids moléculaire.

4.3.5 Production de dilipides par *E. coli* BL21(DE3)

Lors de la première tentative d'expression de *rhIA* chez *E. coli* via le vecteur d'expression pAPR1, aucune production de dilipides n'avait été détectée dans le milieu de culture, même en présence d'IPTG.

Dans la deuxième tentative d'expression, via le vecteur pAPR3, le surnageant de culture a été analysé par CL/SM afin de détecter une production de dilipides. La figure 4.9 montre clairement que la souche BL21(DE3)(pAPR3) est capable de produire toutes les gammes de dilipides lorsqu'elle exprime RhIA. Les mêmes analyses effectuées en présence du vecteur pUCP18 ne montrent aucune trace de biosurfactants.

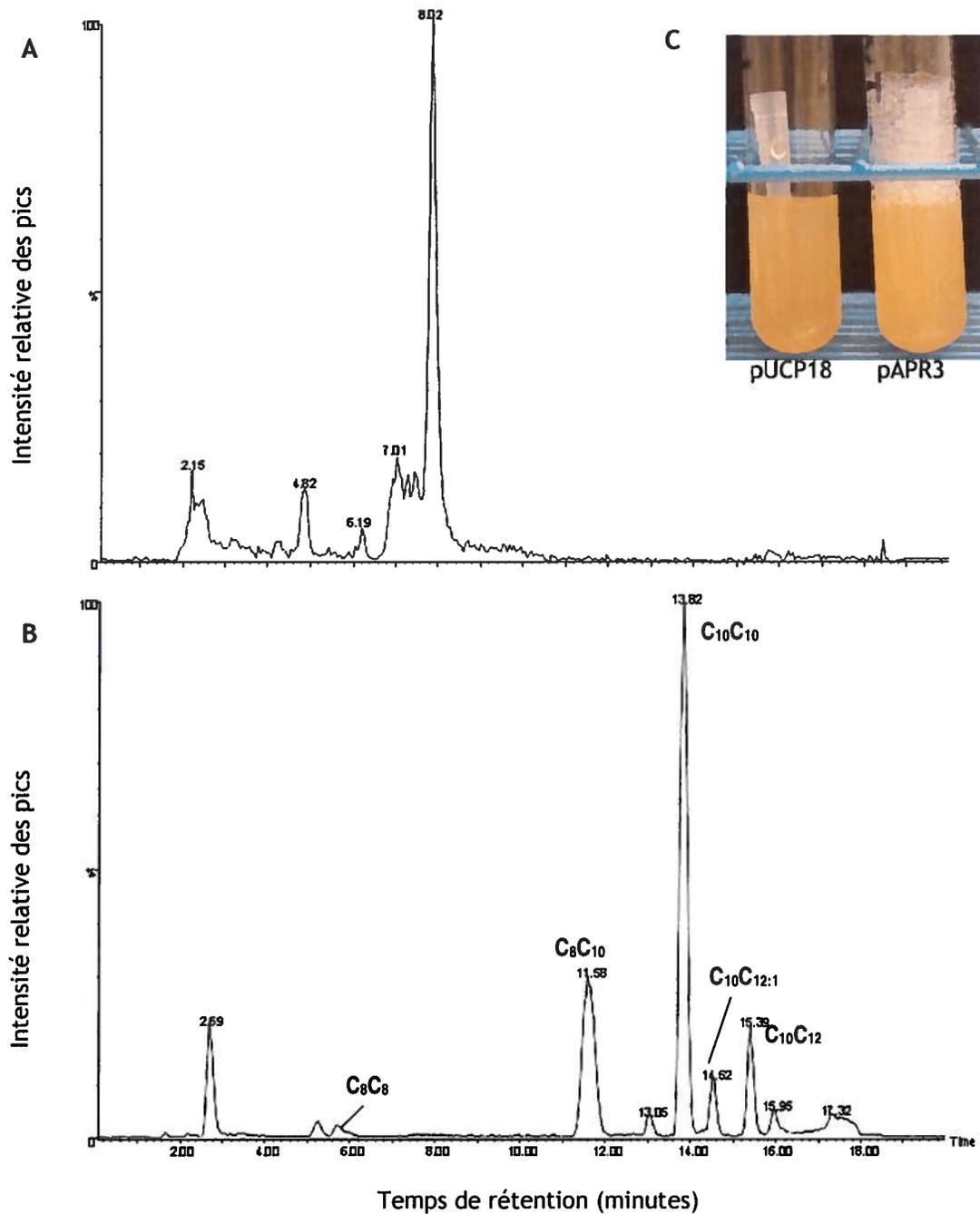


Figure 4.9 - Profils chromatographiques des surnageants de culture des souches (A) BL21(DE3)(pUCP18) et (B) BL21(DE3)(pAPR3) détectés par CL/MS. L'échelle de temps est la même pour les deux profils. (C) Photos des souches BL21(DE3)(pUCP18) et BL21(DE3)(pAPR3) ensemencées dans 3 ml de milieu LB après 12 h d'agitation à 37 °C. Les principaux dilipides produits sont identifiés par C_nC_m.

4.3.6 Production de dilipides en milieu minimal M9

4.3.6.1 Optimisation du milieu M9 + acétate

En prévision de travailler avec de l'acétate doublement marqué au ^{13}C comme seule source de carbone, il était important, de s'assurer préalablement que BL21DE3(pAPR3) était capable de produire des dilipides dans un milieu minimal (M9) avec l'acétate pour seule source de carbone. Différentes concentrations d'acétate (0.1 %, 0.5 %, 1 % et 2 %) ont été testées afin d'obtenir le plus haut rendement possible de dilipides en le moins de temps possible (48 h). La figure 4.10 montre qu'après 48 h à 37°C, c'est le milieu M9 contenant 0.5 % d'acétate qui présentait le meilleur rendement avec 2.72 ppm.

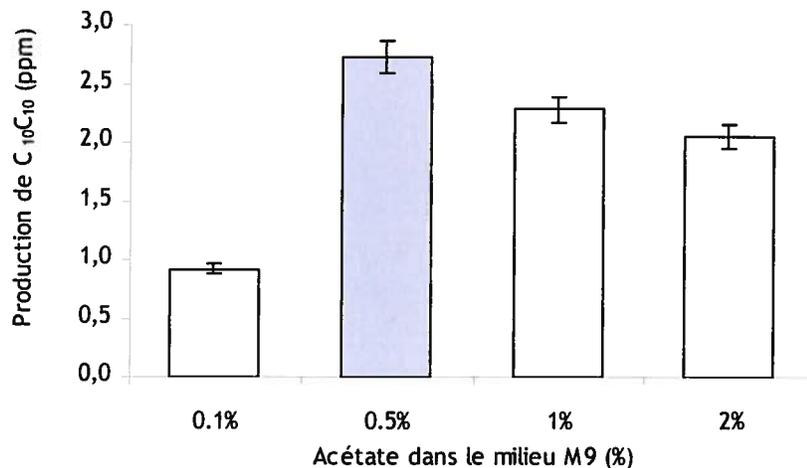


Figure 4.10 - Optimisation de la concentration en acétate dans le milieu minimal M9 pour produire des dilipides en 48 h. Les analyses CL/SM ont fait le suivi du dilipide C₁₀C₁₀ (m/z = 357). Toutes les cultures ont été faites en triplicata.

4.3.6.2 Production de dilipides marqués au ^{13}C

En présence d'acétate doublement marqué au ^{13}C comme seule source de carbone dans le milieu minimal M9, il était important pour la suite des expériences, de s'assurer de ne pas

avoir de production de dilipides non-marqués. La figure 4.11 montre que dans ces conditions la souche BL21(DE3)(pAPR3) ne produit pas de dilipides non-marqués (absence de pic chromatographique), mais uniquement des dilipides marqués au ^{13}C .

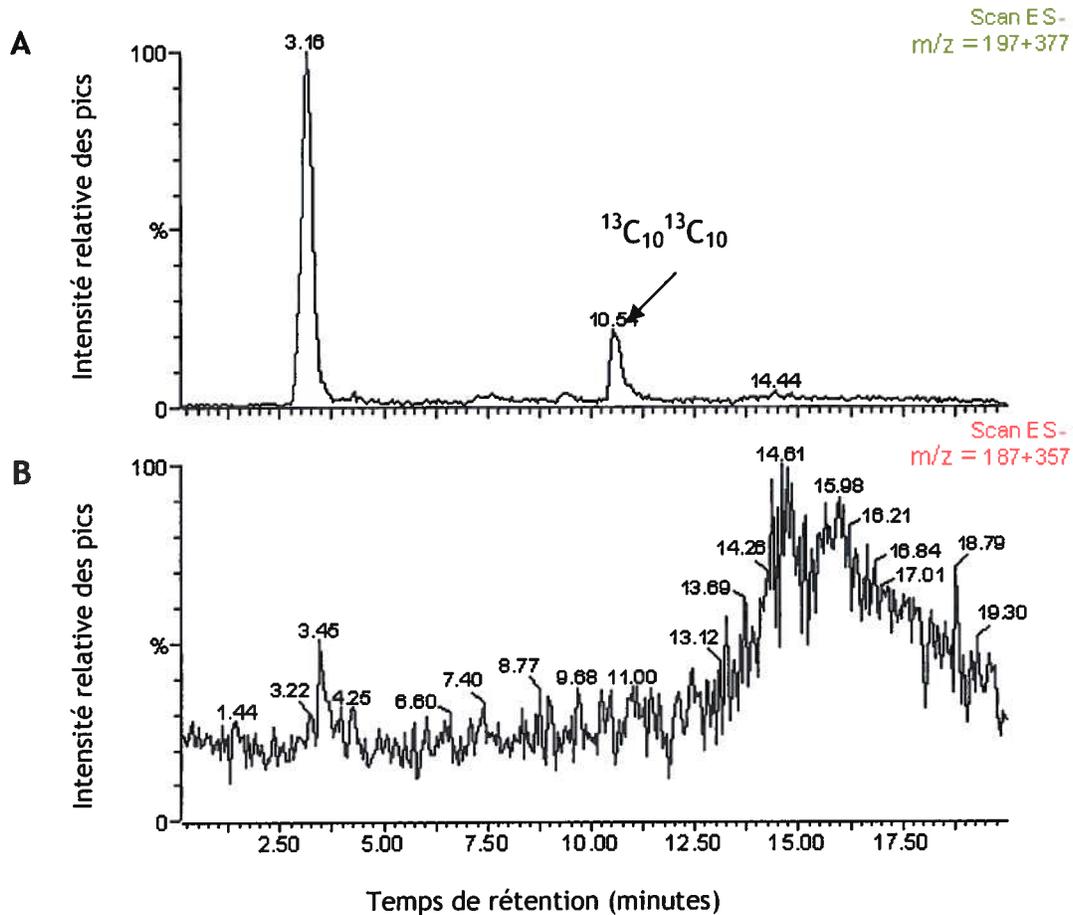


Figure 4.11 - Profils chromatographiques des dilipides $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ (A) marqués ($m/z = 357$) et (B) non-marqués ($m/z = 377$) au ^{13}C , détectés par CL/SM dans le surnageant de culture de la souche BL21(DE3)(pAPR3) en milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate doublement marqué au ^{13}C .

De plus, la figure 4.12 montre que les dilipides marqués au ^{13}C et produits dans le milieu minimal M9 en présence d'acétate doublement marqué, présentent le même profil que les dilipides produits en milieu LB par la souche BL21(DE3)(pAPR3). Le dilipide $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ reste le dilipide majoritairement formé.

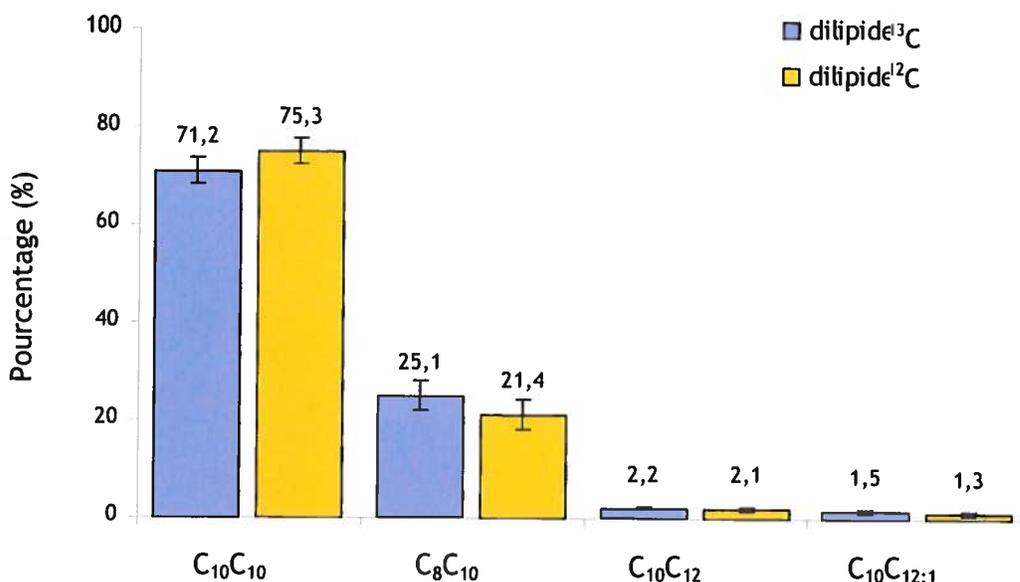


Figure 4.12 - Profil des dilipides produits par BL21(DE3)(pAPR3). En bleu : les dilipides marqués (¹³C) sont produits dans le milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate doublement marqué au ¹³C. En orange : les dilipides non marqués (¹²C) sont produits dans le milieu LB. Les valeurs sont en pourcentage (%).

4.3.7 Production de rhamnolipides par le mutant PA2871 « tesB like »

La souche PA2871 est mutée pour le gène *tesB like* qui code pour une hydroxyacyl-CoA thioesterase. Cette estérase utilise les 3-hydroxyacyl-CoA comme substrat pour produire des acides 3-hydroxyalcanoïque (Sabirova *et al.* 2006). Ainsi, si cette enzyme est mutée, son substrat, le 3-hydroxyacyl-CoA, devrait s'accumuler ou être utilisé pour d'autres voies de biosynthèse telles que celle des biosurfactants, où on suppose qu'il serait utilisé par RhlA. Ainsi, la figure 4.13 permet de comparer la production de rhamnolipides entre ce mutant et la souche PAO1. En effet les analyses CL/SM ont révélé que pour une même DO_{600nm} de 6.3 dans un milieu LB à 37°C, le mutant PA2871 produit trois fois plus de RRC₁₀C₁₀ que PAO1 (99.25 et 32.07 ppm respectivement).

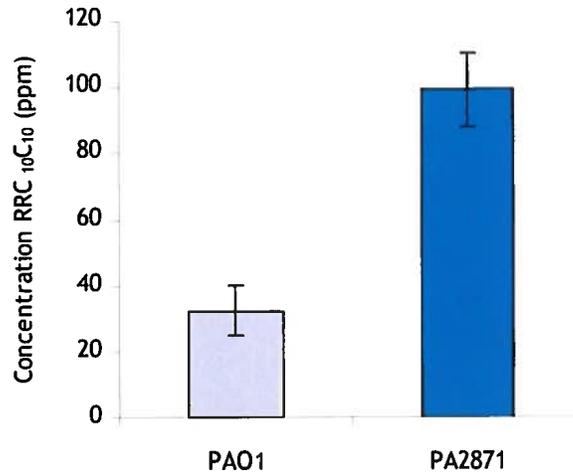


Figure 4.13 - Comparaison de la production de rhamnolipides entre les souches PAO1 et PA2871. Les souches ont été cultivées en triplicata dans un milieu LB à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 6.3.

4.3.8 Tests enzymatiques

Plusieurs hypothèses quant à la nature du substrat de RhlA, ont été testées : l'acide 3-hydroxydécanoïque (C_{10}) en présence ou non de la coenzyme A (CoA), l'acyl 3-hydroxydécanoyl-CoA ou le 3-hydroxydécanoyl-ACP.

Dans un premier temps, nous avons effectué plusieurs tests enzymatiques à partir des fractions cytoplasmiques de la souche BL21(DE3)(pAPR3) qui exprime RhlA. En effet, en travaillant avec des extraits cellulaires on pensait pallier à un éventuel manque de co-facteur. Étant donné la production de dilipides par la souche BL21(DE3)(pAPR3), nous savions que tous les éléments nécessaires à la réaction enzymatique étaient présents dans cette cellule. La figure 4.14 montre une légère augmentation des dilipides en présence du $C_{10}CoA$ après 5 minutes d'incubation. En absence de substrat, les dilipides ont tendance à rester stables sauf après 20 minutes, où ils ont tendance à diminuer. Cette expérience a été répétée 4 fois. Cependant, l'effet du substrat ne nous semblait pas suffisamment significatif, alors nous avons changé notre stratégie.

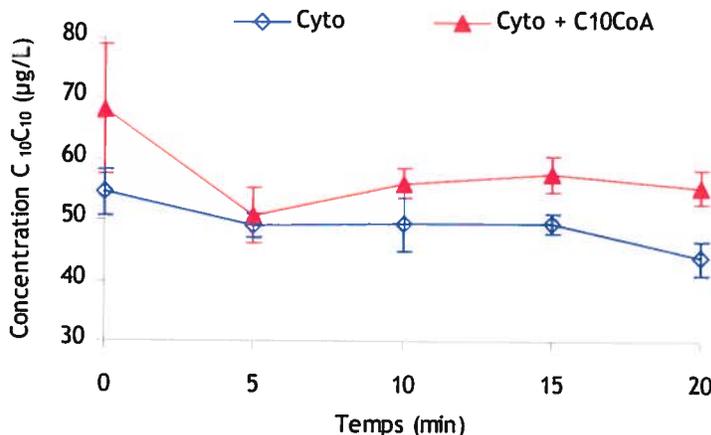


Figure 4.14 - Suivi des dilipides C₁₀C₁₀ (m/z = 357) dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) en absence (-◇-) et en présence (-▲-) du substrat C₁₀CoA.

En effet, nous supposons que la présence des dilipides déjà présents empêchait de voir les dilipides nouvellement produits suite à l’ajout du substrat potentiel. Nous avons donc mis au point un protocole permettant de différencier les dilipides potentiellement formés, suite à l’ajout des substrats, par rapport aux dilipides déjà présents dans l’extrait cellulaire.

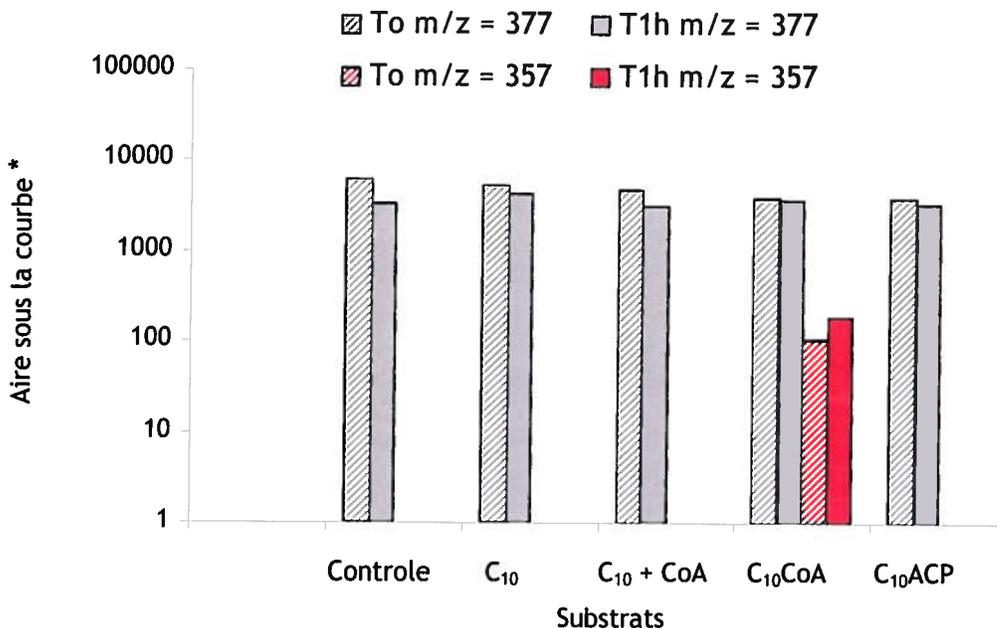


Figure 4.15 - Suivi des dilipides C₁₀C₁₀ marqués (m/z = 377) et non marqués (m/z = 357) au ¹³C dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) en présence des différents substrats. La fraction cytoplasmique provient d’une souche qui a été cultivée dans un milieu M9 + 0.5 % acétate doublement marqué au ¹³C pendant 2 jours à 37°C.* Echelle logarithmique.

Dans un deuxième temps, en attendant de pouvoir purifier la protéine RhIA recombinante en condition native, nous nous sommes intéressé à travailler *in vitro* dans une fraction cytoplasmique de BL21(DE3)(pAPR3) où les dilipides déjà présents dans l'extrait sont marqués au ^{13}C .

La figure 4.15 montre qu'il n'y a qu'en présence du substrat C_{10}CoA qu'on observe l'apparition de dilipides $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ non marqués au ^{13}C . Cependant, on remarque aussi qu'au temps T_0 on observe déjà des dilipides non marqués. Une analyse CL/SM du substrat synthétisé (C_{10}CoA) nous montre qu'il n'y a pas de présence de dilipides non marqués. Ainsi l'apparition des dilipides ($\text{C}_{10}\text{C}_{10}$, $m/z = 357$) dans ce test enzymatique est uniquement due à la présence de RhIA dans la fraction cytoplasmique.

La présence des dilipides marqués au ^{13}C au temps zéro s'expliquerait par le temps écoulé entre le moment où le substrat est ajouté pour initier la réaction et le moment où l'échantillon est prélevé pour en extraire et analyser les dilipides nouvellement synthétisés. L'augmentation des dilipides non marqués après 1 h de réaction, quoique faible, en plus de l'absence totale de dilipides non marqués en présence des autres substrats testés, semblent indiquer que le 3-hydroxyacyl Coenzyme A serait le substrat de RhIA.

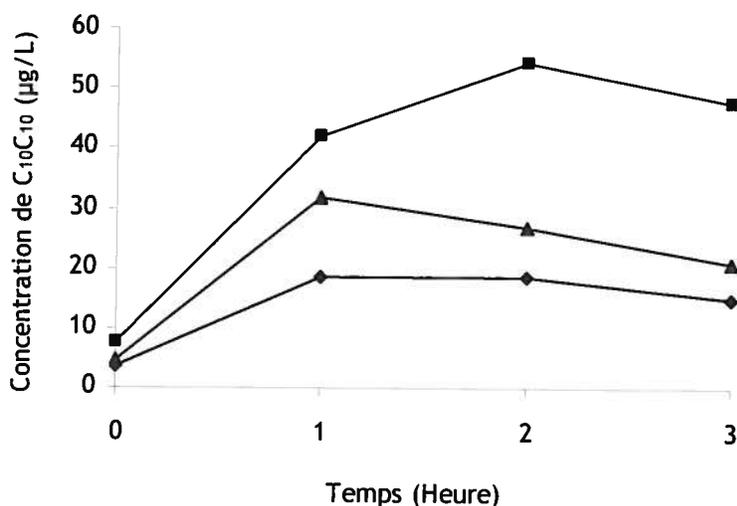


Figure 4.16 - Suivi des dilipides $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ ($m/z = 357$) en présence du substrat C_{10}CoA , dans la fraction cytoplasmique de la souche BL21(DE3)(pAPR3) cultivée dans un milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate doublement marqué au ^{13}C . Les trois courbes correspondent à un triplicata.

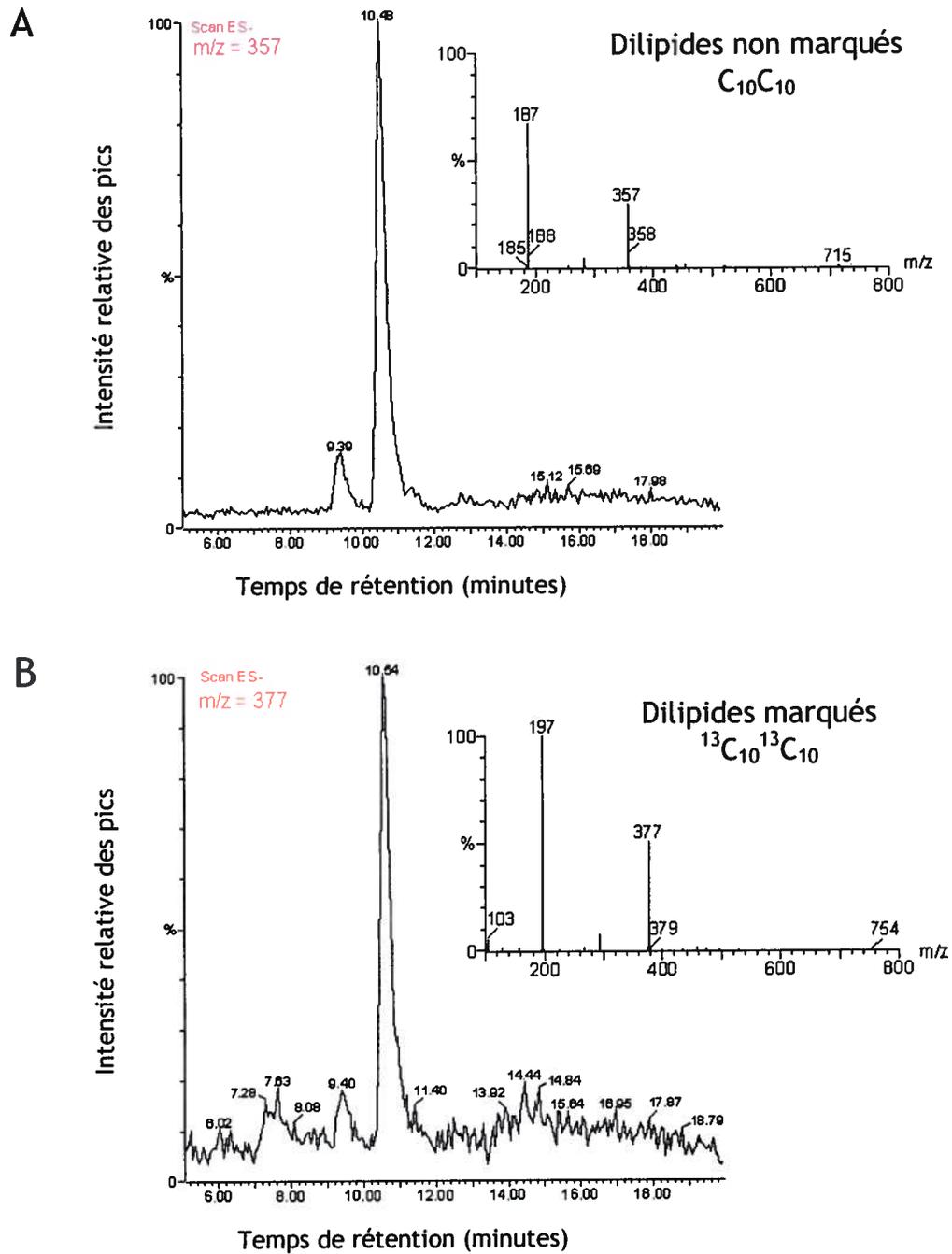


Figure 4.17 - Profils chromatographiques et spectres de masse détectés par CL/SM des surnageants de culture de la souche BL21(DE3)(pAPR3) dans un milieu minimal M9 + 0.5 % d'acétate (A) non marqué et (B) doublement marqué au ^{13}C .

Une fois que la méthode de discrimination entre les dilipides marqués et non marqués au ^{13}C a été validée, les tests enzymatiques ont été effectués *in vivo* à partir des fractions cytoplasmiques des souches BL21(DE3)(pAPR3) cultivées en milieu minimal en présence d'acétate doublement marqué. La figure 4.16 permet de visualiser la production des dilipides néoformés et non marqués suite à l'ajout du substrat C_{10}CoA dans la fraction cytoplasmique. Bien que les dilipides soient en très faible quantité, ceci est un autre résultat qui supporte l'hypothèse que le 3-hydroxydécanoïque-CoA est un substrat potentiel de RhIA.

La figure 4.17 montre que les dilipides marqués au ^{13}C présentent le même chromatogramme que les dilipides non marqués. Les deux types de dilipides présentent des temps de rétention similaires. Afin de les différencier on peut se fier à leur spectre de masse qui présente l'ion pseudomoléculaire principal ($m/z = 357$ et 377) et les fragments issus de la fragmentation par collision ($m/z = 187$ et 197 respectivement).

Enfin, pour compléter ces résultats il était important de tester le C_{10}CoA comme substrat avec la protéine recombinante purifiée. Donc après avoir purifié RhIA recombinante en condition native sur une colonne d'affinité au nickel (Fig. 4.3), nous l'avons testée en présence du 3-hydroxydécanoïl-coenzyme A à 37°C pendant 4 heures.

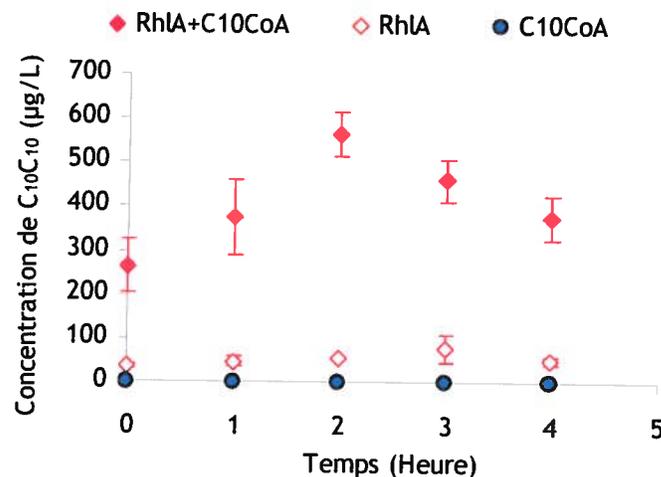


Figure 4.18 - Suivi des dilipides $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ ($m/z = 357$) en présence de RhIA recombinante de la souche BL21(DE3)(pAPR3) purifiée et du substrat C_{10}CoA .

La figure 4.18 montre que la protéine recombinante RhIA exprimée et purifiée chez BL21(DE3)(pAPR3) semble capable d'utiliser le 3-hydroxydécanoyl-CoA (C_{10} CoA) synthétisé *in vitro* pour produire des dilipides. Le suivi des dilipides dans le test contrôle ne contenant que la protéine (sans substrat) montre quand même des traces de dilipides. Ces dilipides, présents en faible quantité proviennent de la fraction cytoplasmique d'où a été purifiée RhIA. Malgré les lavages effectués sur la colonne de purification, il restait toujours ces traces de dilipides qui restent stables au cours du temps. De plus, le suivi des dilipides dans l'échantillon ne contenant que le substrat C_{10} CoA montre qu'il n'y a pas de production de dilipides en absence de RhIA (en bleu sur la figure 4.18).

4.3.9 Analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem

Les figures 4.19 et 4.20 montrent les résultats des analyses protéomiques qui ont permis de confirmer que les protéines purifiées par colonne d'affinité en conditions dénaturante et native (Fig. 4.3 et 4.4) correspondent bien à RhIA de *P. aeruginosa*.

Après séquençage peptidique par SM/SM, respectivement 66 % et 71 % des peptides tryptiques prédits ont été identifiés par l'analyse de leur fragmentation avec le logiciel MASCOT. De plus, le facteur de confiance Mowse élevé (750 et 995 respectivement) permet de conclure que l'identité de la protéine que l'on a purifiée n'est pas due au hasard. Plus la valeur du facteur de confiance Mowse est forte et plus on peut avoir confiance en l'identité de la protéine analysée. La valeur seuil du facteur de confiance se situe à 52. Donc nous sommes en mesure d'affirmer que la protéine éluée et purifiée par colonne d'affinité au nickel correspond bien à RhIA. C'est la protéine purifiée en condition native (Fig. 4.19 et 4.20) qui a été utilisée pour faire les tests enzymatiques.

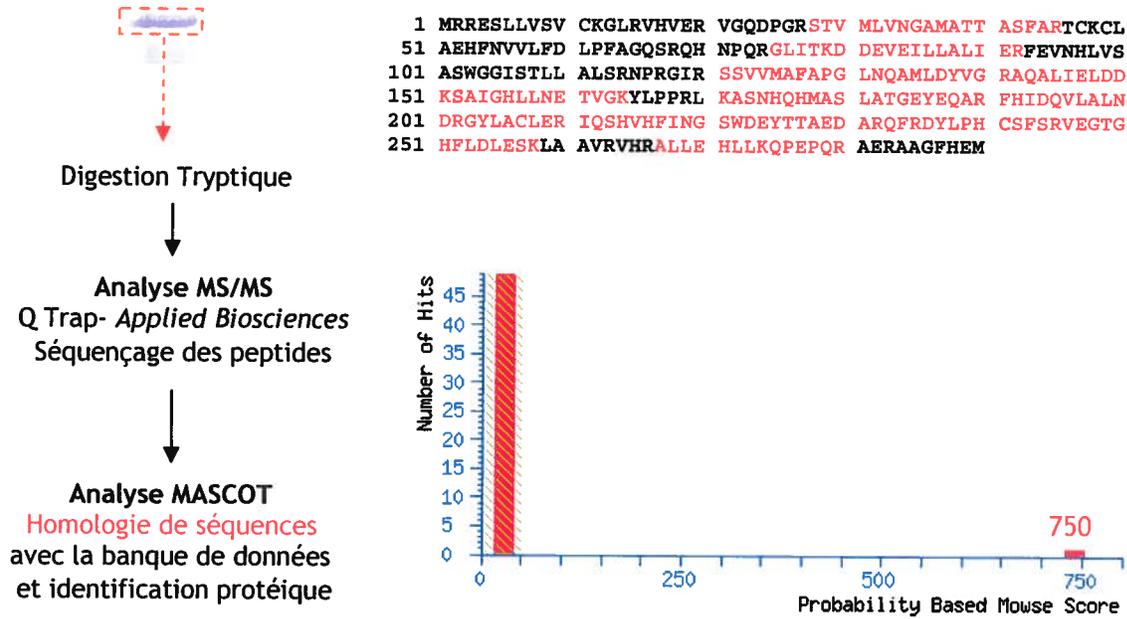


Figure 4.19 - Identification de la protéine purifiée en condition dénaturante par colonne d'affinité au nickel à partir de la souche BL21(DE3)(pAPR1). Les séquences en rouge correspondent aux peptides identifiés par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine dans le gel de polyacrylamide. L'indice de confiance Mowse indique la probabilité que cette identification n'est pas due au hasard.

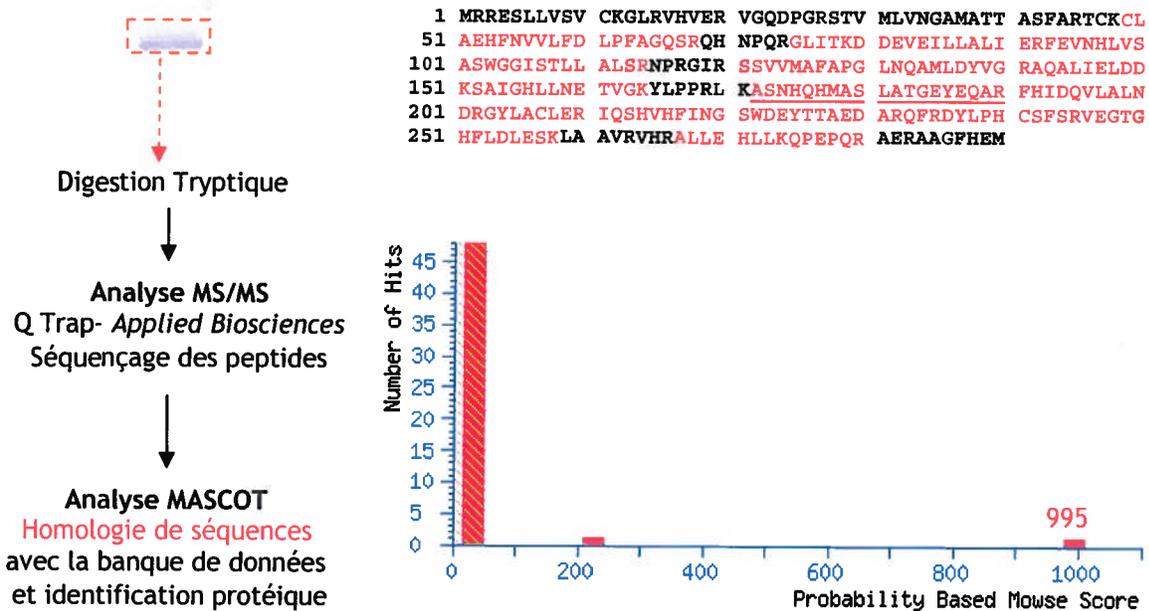


Figure 4.20 - Identification de la protéine purifiée en condition native par colonne d'affinité au nickel à partir de la souche BL21(DE3)(pAPR3). Les séquences en rouge correspondent aux peptides identifiés par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine dans le gel de polyacrylamide. L'indice de confiance Mowse indique la probabilité que cette identification n'est pas due au hasard.

Lors des analyses peptidiques de RhlA après digestion à la trypsine dans le gel de polyacrylamide, une séquence aminée a été mise en avant et pourrait être impliquée dans le site actif de l'enzyme. En effet grâce à l'accumulation des ions détectés par spectrométrie de masse le logiciel Analyst nous a aidé à mettre en évidence deux ions pseudomoléculaires, m/z 526 et 594 (Fig. 4.21) chargés positivement 4 fois. Bien qu'à priori différents, ces deux ions présentent la particularité d'avoir le même spectre de masse après fragmentation (Fig. 4.21-AB).

Les analyses SM/SM présentées dans la figure 3.30 permettent de déduire la séquence peptidique des ions pseudomoléculaires observés par spectrométrie de masse. Si on se réfère aux ions de la série y issus de cette fragmentation, il apparait que les deux ions pseudomoléculaires présentent la même séquence peptidique C-terminale que le peptide tryptique théorique (Fig. 4.22-C) : ASNHQHMASLATGEYEQAR (séquence soulignée dans la figure 4.20).

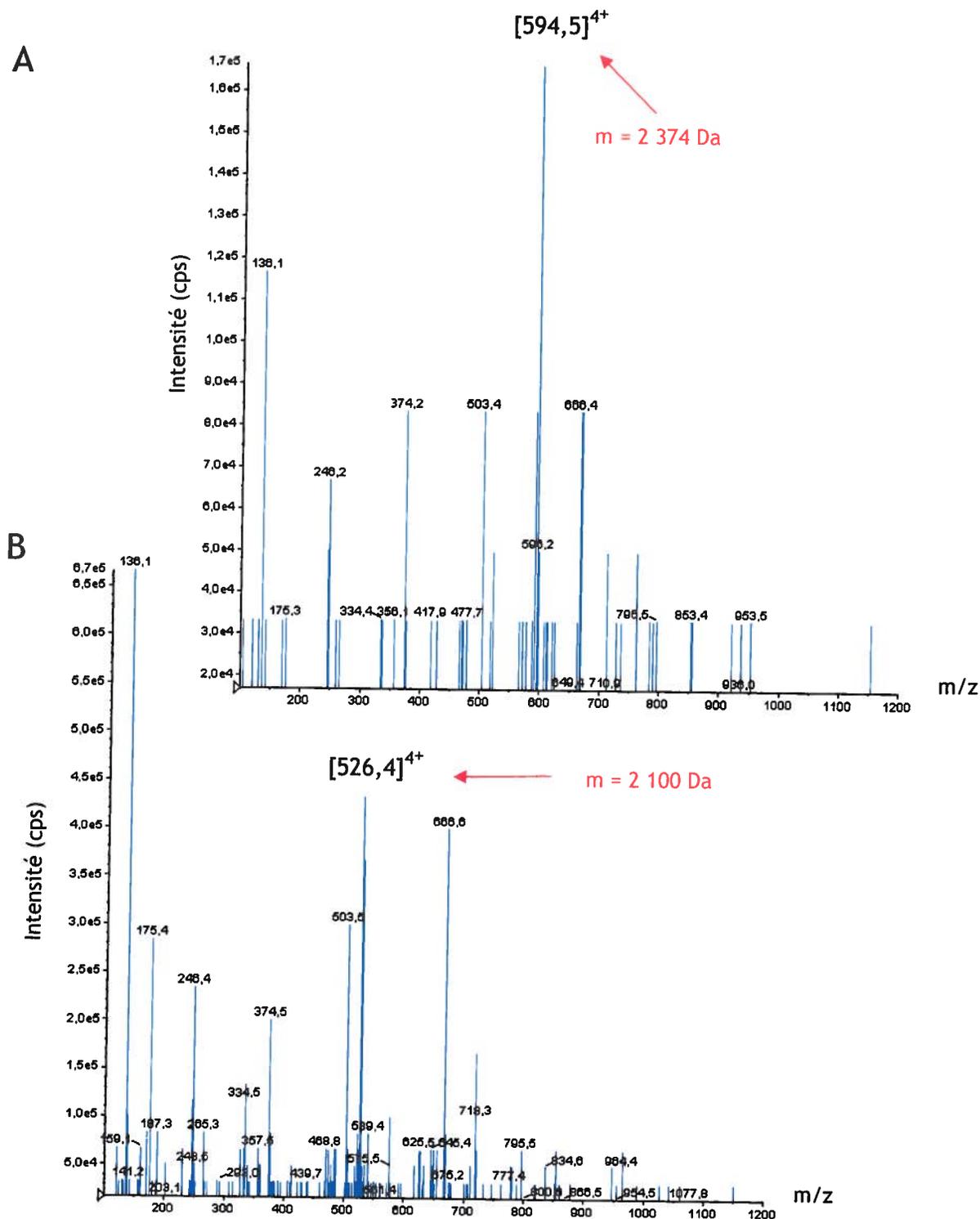


Figure 4.21 - Spectres de masse de deux ions pseudomoléculaires (m/z) observés lors des analyses protéomiques de RhIA purifiée en condition native. A- Spectre de masse de l'ion $m/z = 594,5$ chargé 4 fois et qui correspond à un peptide de 2 374 Daltons. B- Spectre de masse de l'ion $m/z = 526,4$ chargé 4 fois et qui correspond à un peptide de 2 100 Daltons.

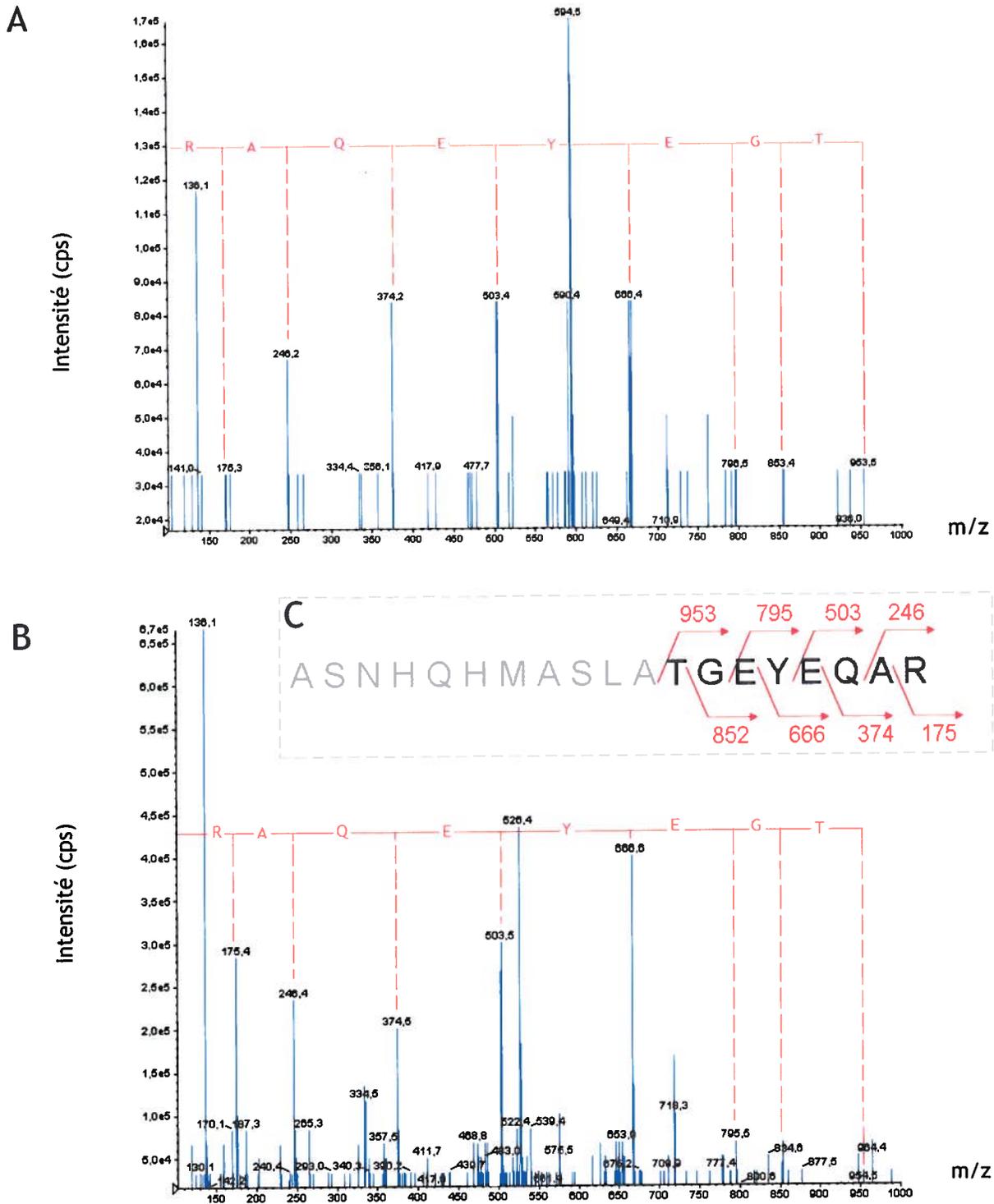


Figure 4.22 - Spectres induits par collision des ions pseudomoléculaires (m/z) 526 et 594. A- Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 594. B- Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 526. C- Fragmentation de la série y d'un peptide séquencé et identifié comme appartenant à RhIA. Les lettres en gris et noir correspondent aux acides aminés. Les flèches représentent les ions issus de la fragmentation de la série y.

La figure 4.23, montre que lors de ces analyses un troisième ion pseudomoléculaire, m/z 701 chargé positivement 3 fois, a aussi été observé pour avoir un profil de fragmentation similaire aux ions 526 et 594. Si on se réfère aux ions de la série y issus de cette fragmentation, il apparait cet ion pseudomoléculaire présente lui aussi la même séquence peptidique C-terminale que le peptide tryptique théorique. De plus en utilisant les ions de la série b, issus de la même fragmentation, on arrive à compléter la séquence peptidique, ce qui permet de valider l'identité du peptide appartenant à RhlA.

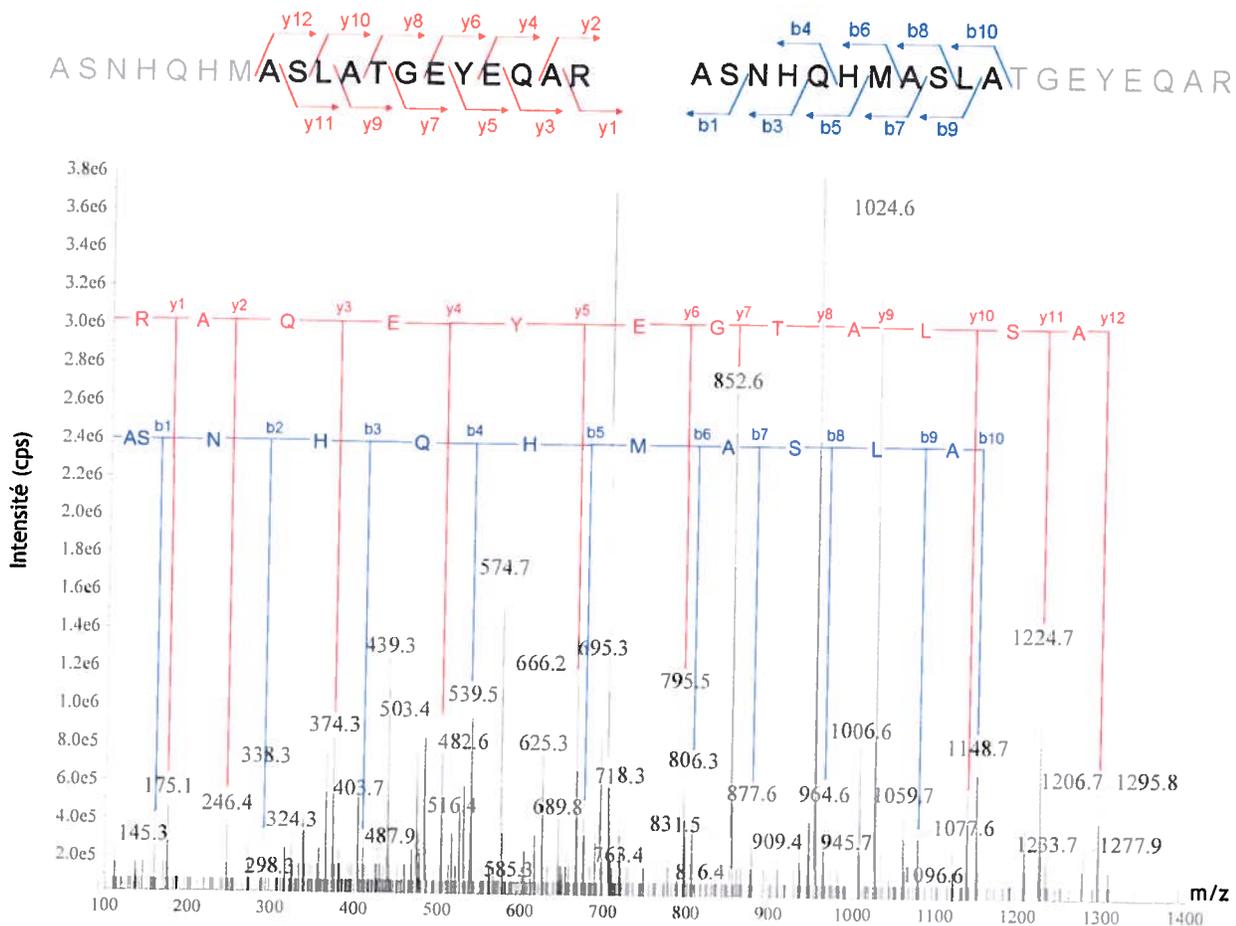


Figure 4.23- Spectre de masse des fragmentations des séries y et b de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 701 séquencé et identifié comme appartenant à RhlA. Les flèches représentent les ions issus de la fragmentation de la série y, en rouge et de la série b en bleu. Les lettres en majuscules rouges et bleues correspondent aux acides aminés.

Les figures 4.24, 4.25 et 4.26 montrent que le logiciel Analyst est capable de détecter et de combiner les ions issus des fragmentations de séries a, b, y et immonium afin de permettre le séquençage des peptides tryptiques.

	Residue	Mass	Immonium	a	a-NH3	b	b-NH3	y	y-NH3
1	A, Ala	71.0371	44.0495	44.0495	27.0229	72.0444	55.0178	2100.9516	2083.9250
2	S, Ser	87.0320	60.0444	131.0815	114.0550	159.0764	142.0499	2029.9145	2012.8879
3	N, Asn	114.0429	87.0553	245.1244	228.0979	273.1193	256.0928	1942.8824	1925.8559
4	H, His	137.0589	110.0713	382.1833	365.1568	410.1783	393.1517	1828.8395	1811.8130
5	Q, Gln	128.0586	101.0709	510.2419	493.2154	538.2368	521.2103	1691.7806	1674.7540
6	H, His	137.0589	110.0713	647.3008	630.2743	675.2957	658.2692	1563.7220	1546.6955
7	M, Met	131.0405	104.0528	778.3413	761.3148	806.3362	789.3097	1426.6631	1409.6366
8	A, Ala	71.0371	44.0495	849.3784	832.3519	877.3733	860.3468	1295.6226	1278.5961
9	S, Ser	87.0320	60.0444	936.4105	919.3839	964.4054	947.3788	1224.5855	1207.5590
10	L, Leu	113.0841	86.0964	1049.4945	1032.4680	1077.4894	1060.4629	1137.5535	1120.5269
11	A, Ala	71.0371	44.0495	1120.5316	1103.5051	1148.5266	1131.5000	1024.4694	1007.4429
12	T, Thr	101.0477	74.0600	1221.5793	1204.5528	1249.5742	1232.5477	953.4323	936.4058
13	G, Gly	57.0215	30.0338	1278.6008	1261.5742	1306.5957	1289.5691	852.3846	835.3581
14	E, Glu	129.0426	102.0550	1407.6434	1390.6168	1435.6383	1418.6117	795.3632	778.3366
15	Y, Tyr	163.0633	136.0757	1570.7067	1553.6802	1598.7016	1581.6751	666.3206	649.2940
16	E, Glu	129.0426	102.0550	1699.7493	1682.7227	1727.7442	1710.7177	503.2572	486.2307
17	Q, Gln	128.0586	101.0709	1827.8079	1810.7813	1855.8028	1838.7762	374.2146	357.1881
18	A, Ala	71.0371	44.0495	1898.8450	1881.8184	1926.8399	1909.8134	246.1561	229.1295
19	R, Arg	156.1011	129.1135	2054.9461	2037.9195	2082.9410	2065.9145	175.1190	158.0924

Figure 4.24- Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 701 analysé par le logiciel Analyst. Les ions -NH₃ correspondent aux ions de chaque série ayant perdu un groupement NH₃. Les valeurs (m/z) en gras et en italique correspondent aux ions détectés par SM.

▼ Fragments [Precursor MW = 2373.9400, Charge = 4]

X | H- | ASNHQHMASLATGEYEQAR

	Residue	Mass	Immonium	a	a-NH3	b	b-NH3	y	y-NH3
1	A, Ala	71.0371	44.0495	44.0495	27.0229	72.0444	55.0178	2100.9516	2083.9250
2	S, Ser	87.0320	60.0444	131.0815	114.0550	159.0764	142.0499	2029.9145	2012.8879
3	N, Asn	114.0429	87.0553	245.1244	228.0979	273.1193	256.0928	1942.8824	1925.8559
4	H, His	137.0589	110.0713	382.1833	365.1568	410.1783	393.1517	1828.8395	1811.8130
5	Q, Gln	128.0586	101.0709	510.2419	493.2154	538.2368	521.2103	1691.7806	1674.7540
6	H, His	137.0589	110.0713	647.3008	630.2743	675.2957	658.2692	1563.7220	1546.6955
7	M, Met	131.0405	104.0528	778.3413	761.3148	806.3362	789.3097	1426.6631	1409.6366
8	A, Ala	71.0371	44.0495	849.3784	832.3519	877.3733	860.3468	1295.6226	1278.5961
9	S, Ser	87.0320	60.0444	936.4105	919.3839	964.4054	947.3788	1224.5855	1207.5590
10	L, Leu	113.0841	86.0964	1049.4945	1032.4680	1077.4894	1060.4629	1137.5535	1120.5269
11	A, Ala	71.0371	44.0495	1120.5316	1103.5051	1148.5266	1131.5000	1024.4694	1007.4429
12	T, Thr	101.0477	74.0600	1221.5793	1204.5528	1249.5742	1232.5477	953.4323	936.4058
13	G, Gly	57.0215	30.0338	1278.6008	1261.5742	1306.5957	1289.5691	852.3846	835.3581
14	E, Glu	129.0426	102.0550	1407.6434	1390.6168	1435.6383	1418.6117	795.3632	778.3366
15	Y, Tyr	163.0633	136.0757	1570.7067	1553.6802	1598.7016	1581.6751	666.3206	649.2940
16	E, Glu	129.0426	102.0550	1699.7493	1682.7227	1727.7442	1710.7177	503.2572	486.2307
17	Q, Gln	128.0586	101.0709	1827.8079	1810.7813	1855.8028	1838.7762	374.2146	357.1881
18	A, Ala	71.0371	44.0495	1898.8450	1881.8184	1926.8399	1909.8134	246.1561	229.1295
19	R, Arg	156.1011	129.1135	2054.9461	2037.9195	2082.9410	2065.9145	175.1190	158.0924

Figure 4.25- Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 594 analysé par le logiciel Analyst. Les ions -NH₃ correspondent aux ions de chaque série ayant perdu un groupement NH₃. Les valeurs (m/z) en gras et en italique correspondent aux ions détectés par SM.

▼ Fragments [Precursor MW = 2099.9400, Charge = 4]

X H- ASNHQHMASLATGEYEQAR

	Residue	Mass	Immonium	a	a-NH3	b	b-NH3	y	y-NH3
1	A, Ala	71.0371	44.0495	44.0495	27.0229	72.0444	55.0178	2100.9516	2083.9250
2	S, Ser	87.0320	60.0444	131.0815	114.0550	159.0764	142.0499	2029.9145	2012.8879
3	N, Asn	114.0429	87.0553	245.1244	228.0979	273.1193	256.0928	1942.8824	1925.8559
4	H, His	137.0589	110.0713	382.7833	365.1568	410.1783	393.1517	1828.8395	1811.8130
5	Q, Gln	128.0586	101.0709	510.2419	493.2154	538.2368	521.2103	1691.7806	1674.7540
6	H, His	137.0589	110.0713	647.3008	630.2743	675.2957	658.2692	1563.7220	1546.6955
7	M, Met	131.0405	104.0528	778.3473	761.3148	806.3362	789.3097	1426.6631	1409.6366
8	A, Ala	71.0371	44.0495	849.3784	832.3519	877.3733	860.3468	1295.6226	1278.5981
9	S, Ser	87.0320	60.0444	936.4105	919.3839	964.4054	947.3788	1224.5855	1207.5590
10	L, Leu	113.0841	86.0964	1049.4945	1032.4680	1077.4894	1060.4629	1137.5535	1120.5269
11	A, Ala	71.0371	44.0495	1120.5316	1103.5051	1148.5266	1131.5000	1024.4694	1007.4429
12	T, Thr	101.0477	74.0600	1221.5793	1204.5528	1249.5742	1232.5477	953.4323	936.4058
13	G, Gly	57.0215	30.0338	1278.6008	1261.5742	1306.5957	1289.5691	852.3846	835.3581
14	E, Glu	129.0426	102.0550	1407.6434	1390.6168	1435.6383	1418.6117	795.3632	778.3366
15	Y, Tyr	163.0633	136.0757	1570.7067	1553.6802	1598.7016	1581.6751	666.3206	649.2940
16	E, Glu	129.0426	102.0550	1699.7493	1682.7227	1727.7442	1710.7177	503.2572	486.2307
17	Q, Gln	128.0586	101.0709	1827.8079	1810.7813	1855.8028	1838.7762	374.2746	357.1807
18	A, Ala	71.0371	44.0495	1898.8450	1881.8184	1926.8399	1909.8134	246.7567	229.7295
19	R, Arg	156.1011	129.1135	2054.9461	2037.9195	2082.9410	2065.9145	175.7190	158.0924

Figure 4.26- Profil de fragmentation des séries a, b et immonium de l'ion pseudomoléculaire (m/z) 526 analysé par le logiciel Analyst. Les ions -NH₃ correspondent aux ions de chaque série ayant perdu un groupement NH₃. Les valeurs (m/z) en gras et en italique correspondent aux ions détectés par SM.

4.4 CARACTERISATION ENZYMATIQUE DE RHLA

4.4.1 La purification de RhlA

L'objectif principal du projet était de déterminer l'activité enzymatique de RhlA qui est impliquée dans la voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. Pour ce faire, il fallait, dans un premier temps, chercher à isoler et purifier la protéine afin de pouvoir l'étudier *in vitro*.

Escherichia coli est l'un des hôtes les plus utilisés pour la surexpression de protéines recombinantes (Choi et Lee, 2004). Sa croissance rapide sur des milieux peu coûteux, son génome bien caractérisé et la grande variété de systèmes d'expression disponibles, en font un candidat privilégié. Dans la présente étude, c'est la souche BL21(DE3) qui a été utilisée pour surexprimer *rhlA*. Cette souche est particulièrement bien adaptée à la surexpression de protéines recombinantes, parce qu'elle présente l'avantage d'avoir une activité protéolytique réduite. En effet, en plus d'être mutée pour le gène *ompT*, qui code pour une protéase de la membrane externe reconnue pour dégrader les protéines hétérologues (Grodberg et Dunn, 1988 ; McCarter *et al.*, 2004), la souche BL21(DE3) est naturellement dépourvue de la protéase ATP dépendante et intracellulaire, Lon qui élimine les protéines non fonctionnelles et qui doivent être rapidement désactivées (Weiner *et al.*, 1994). Ensuite, le vecteur pUCP18 a été choisi pour sa capacité à être à la fois utilisé chez *P. aeruginosa* et chez *E. coli* (Schweizer 1991 ; West *et al.* 1994).

La purification d'une protéine RhlA recombinante fonctionnelle a été une très longue étape de notre projet. En effet dans un premier temps nous avons travaillé avec un système d'expression pAPR1 chez BL21(DE3) qui ne permettait de purifier la protéine recombinante qu'en condition dénaturante en présence de 8M d'urée. Afin de pouvoir tester les fonctions enzymatiques de la protéine recombinante avec différents substrats, il était important d'obtenir la protéine sous sa forme native et fonctionnelle. On a donc procédé à différentes tentatives de renaturation mais à chaque fois sans succès : dialyse, dilution rapide, renaturation sur colonne d'affinité et gel de filtration. En effet, lors de chacune de ces tentatives les protéines formaient des agrégats et précipitaient.

Suite à ces tentatives non concluantes, nous avons élaboré un deuxième système d'expression pour RhIA chez la souche BL21(DE3) en construisant le vecteur pAPR3. Dans la construction du vecteur pAPR1, la queue poly-histidine se trouve en C-terminal du gène codant pour RhIA, alors que dans la construction pAPR3, utilisée pour la suite de nos expériences, la queue polyhistidine se trouve en position N-terminale. De plus la séquence Shine-Dalgarno (SD) propre à *rhIA* chez *P. aeruginosa* a été ajoutée. La séquence SD correspond à la séquence située en amont du codon d'initiation reconnue par les ribosomes sur l'ARNm afin d'initier la traduction (Shine et Dalgarno, 1974). En fait, une première tentative d'expression a été effectuée sans l'ajout de cette séquence SD, mais sans succès. En effet, bien que la souche ait été capable de produire des dilipides dans le milieu de culture, nous avons été incapables de détecter la protéine recombinante par électrochimiluminescence suite à un immunobuvardage de type Western des protéines totales de la bactérie. On a supposé que la protéine était présente et fonctionnelle mais en quantité insuffisante pour être exploitée pour une purification à des fins de caractérisation enzymatique. Pour tenter de pallier à ce nouvel obstacle, nous avons inclus la séquence SD propre au gène *rhIA*. En effet, la position et la longueur de cette séquence sont des paramètres importants qui influencent l'efficacité de la traduction (Barrick *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1994). D'ailleurs aucune séquence SD n'a été retrouvée sur le vecteur pUCP18. Lors de la construction du vecteur pAPR1, cette séquence SD était incluse dans la séquence insérée entre les sites *EcoRI* et *HindIII* du site multiple de clonage du vecteur pUCP18. C'est donc en faisant ces modifications que nous avons obtenu la souche BL21(DE3)(pAPR3) capable d'exprimer la protéine recombinante et de produire des dilipides (Fig. 4.8).

A partir de là il a été possible de purifier la protéine recombinante, non plus en condition dénaturante, mais en condition native (Fig. 4.4).

4.4.2 La localisation cellulaire de RhIA

Au début du projet, la littérature laissait à penser que RhIA était une protéine reliée à la membrane cytoplasmique et interagissait avec RhIB, jouant ainsi soit le rôle de stabilisateur protéique de RhIB ou de transporteur du substrat de RhIB (Ochsner, Fiechter et Reiser, 1994 ; Rahim *et al.* 2001). Cependant aucune étude n'avait encore clairement établi la localisation cellulaire de RhIA chez *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps l'analyse des 70 premiers acides aminés de RhIA par le programme de prédiction SignalP 2.0 server (Nielsen *et al.* 1997 ; Bendtsen *et al.*, 2004) n'a rien donné de concluant quant à la présence d'un éventuel peptide signal. Ensuite, l'immunobuvardage de type Western effectué à partir des fractions cellulaires du mutant UO299 complémenté avec RhIA recombinante (Fig. 4.8), nous indique formellement que RhIA est une protéine cytoplasmique. De la même manière, lorsque RhIA recombinante est surexprimée chez *E. coli*, c'est à partir de la fraction cytoplasmique qu'elle est ensuite purifiée, indiquant bien que RhIA n'est pas une protéine membranaire, ni extracellulaire.

4.4.3 Caractérisation enzymatique de RhIA

Dans l'étude des mutants $\Delta rhIA$ et $\Delta rhIB$ de Déziel *et al.* (2003) il avait été mis en évidence que RhIA était une protéine indispensable à la production des rhamnolipides et surtout des dilipides. Cependant, il restait encore à déterminer si RhIA était directement responsable de la production des dilipides ou simplement impliquée plus en amont dans la voie de biosynthèse des biosurfactants.

Une première étape du projet a été de complémenter la mutation chez la souche UO299 (Fig. 4.5). Ainsi après 7 jours de culture il a été possible d'obtenir une production de dilipides de 523 ppm, résultat qui mettait bien en évidence que RhIA n'était plus seulement impliquée, mais directement responsable de la production des dilipides. Ces résultats ont été confirmés par la complémentation du mutant $\Delta rhIA$ chez PAO1 (Fig. 4.6 et 4.7). De plus, la production de dilipides chez *E. coli* exprimant RhIA (Fig. 4.9), indique clairement que RhIA seule est responsable de la production des dilipides.

Ainsi connaissant l'identité du produit de RhIA, le défi principal du projet consistait à déterminer l'identité du substrat de RhIA. Pour cela il y avait plusieurs hypothèses de travail. En effet, compte tenu que RhIA possède 44 % d'identité avec la séquence de PhaG (Rehm, Kruger et Steinbuchel, 1998), il était possible que RhIA soit aussi une hydroxyacyl-ACP-CoA transférase. Les substrats potentiels pour une telle enzyme étant soit l'hydroxyacyl-ACP, soit l'hydroxyacyl-CoA.

Pour vérifier cette hypothèse, dans un premier temps il aura fallu synthétiser ces deux substrats, avec le souci de conserver la chiralité propre à la famille des rhamnolipides. En effet, les fonctions 3-hydroxyacide des rhamnolipides et des dilipides sont exclusivement sous la forme dextrogyre. Il fallait donc fabriquer des substrats ayant cette même chiralité. Donc, dans le but d'éviter toute compétition ou inhibition réactionnelle de la formation de dilipides par RhlA à cause éventuellement de la présence de l'autre énantiomère, les substrats n'ont pas été synthétisés à partir du mélange racémique d'acide 3-hydroxydécanoïque, qui est le seul disponible commercialement, mais plutôt à partir d'acide 3-hydroxydécanoïque issu d'une hydrolyse chimique des rhamnolipides et ayant donc la bonne chiralité.

Dans l'optique d'un travail avec une protéine purifiée et afin de prévenir l'absence éventuelle d'un co-facteur essentiel potentiellement présent dans le cytoplasme de *P. aeruginosa* mais non dans celui d'*E. coli* les tests enzymatiques *in vitro* ont été réalisés, dans un premier temps, dans les fractions cytoplasmiques des souches sauvages (PG201) et mutantes (UO287 et UO299). En effet, au début, l'hypothèse de la présence d'un cofacteur essentiel était supportée par le fait que la souche BL21(DE3)(pAPR1) ne produisait pas de dilipides alors que la même protéine RhlA recombinante exprimée chez la souche UO299 avait réussi à compléter la mutation (Fig. 4.5). Cependant, indépendamment du substrat utilisé (hydroxyacyl-ACP, hydroxyacyl-CoA ou l'acide 3-hydroxydécanoïque avec ATP) aucune production de dilipide n'a été observée. Il a donc été conclu que soit la protéine exprimée chez *E. coli* était non-fonctionnelle, soit qu'aucun des substrats testés n'était le bon ou que les conditions du test *in vitro* ne permettaient pas d'obtenir des dilipides.

C'est ainsi que nous avons élaboré une nouvelle stratégie pour purifier la protéine recombinante en changeant la queue poly-histidine de place.

Une fois la protéine recombinante exprimée et établie comme fonctionnelle chez BL21(DE3)(pAPR3), tous les résultats obtenus lors des tests enzymatiques tendent à démontrer que le substrat de RhlA est le 3-hydroxyacyl-CoA. En effet que ce soient les tests effectués à partir des extraits cytoplasmiques de BL21(DE3)(pAPR3) (Fig. 4.14; 4.15 et 4.16), ou les tests *in vitro* à partir de la protéine recombinante purifiée en condition native (Fig. 4.18), on constate une production de dilipides et ce uniquement lorsque le substrat C₁₀CoA est présent en même temps que RhlA. Cependant, ces résultats qui ne sont que préliminaires, nécessiteraient des expériences complémentaires pour confirmer l'idée que les 3-hydroxyacyl-

CoA puissent être des substrats de RhlA au même titre que le sont les 3-hydroxyacyl-ACP, comme démontré par Zhu et Rock (2008), peu de temps après la fin de ce travail.

Tout d'abord contrairement à Zhu et Rock (2008), nos tests n'ont pas été effectués avec différentes concentrations de RhlA recombinante, ni avec différentes concentrations de substrat afin d'obtenir l'activité enzymatique (mole/min) de rhlA. Nous n'avons observé qu'une production de dilipides au cours du temps pour une enzyme et un substrat à concentration fixe (Fig.4.14 ; 4.16 et 4.18). Afin d'éliminer la possibilité d'une déficience d'un cofacteur lors de l'utilisation d'une protéine recombinante, nous avons effectué les tests enzymatiques à partir des fractions cytoplasmiques de BL21(DE3)(pAPR3) exprimant la protéine recombinante. Cependant, comme les extraits cytoplasmiques contenaient déjà des dilipides précédemment produits avant l'ajout du substrat (Fig. 4.14) et afin de bien identifier les dilipides nouvellement formés par l'addition des substrats, nous avons eu l'idée de marquer tous les dilipides intrinsèques au ^{13}C en produisant les dilipides à partir d'un milieu minimal avec pour seule source de carbone de l'acétate doublement marqué au ^{13}C . Avec cette approche, nous avons observé l'apparition de dilipides non-marqués uniquement après l'ajout du substrat C10CoA (Fig. 4.15). Une fois cette approche mise au point (Fig. 4.16), des tests enzymatiques dans les fractions cytoplasmiques des cellules produisant des dilipides marqués ont été effectuées et c'est ainsi que l'on a pu observer la production au cours du temps de dilipides non marqués en présence du C₁₀CoA. Ceci confirme que le 3-hydroxydécanoyl-CoA a bien été utilisé par RhlA pour produire des dilipides.

Enfin, après avoir purifié la protéine recombinante, celle-ci a été testée en condition *in vitro* en présence de C10CoA. Une fois de plus, dans ces conditions, on a réussi à observer une production de dilipides au cours du temps et ce malgré que la production de dilipides C₁₀C₁₀, soit relativement faible (550 µg/L en 2 h.) et qu'elle ait en plus tendance à diminuer après 2 h d'incubation au lieu de se stabiliser (Fig. 4.18). De plus, l'apparition des dilipides se fait vraiment très rapidement, au point qu'au temps zéro on observe déjà une production de dilipides (Fig. 4.15, 4.16 et 4.18). Cette production initiale de dilipides aurait pu être attribuée à une contamination du substrat, mais les analyses SM ont permis d'infirmer cette hypothèse. De plus, en analysant le mélange réactionnel en absence de RhlA au cours du temps, on constate qu'il n'y a pas de formation de dilipides (Fig. 4.18). Il est donc difficile d'expliquer pourquoi il n'y a apparition de dilipides nouvellement formé qu'en présence de RhlA autrement que par une activité enzymatique de RhlA vis-à-vis le C10CoA (Fig. 4.15 et 4.18).

4.4.4 Chiralité du substrat de RhlA

Afin de prévenir la possibilité d'une compétition et/ou inhibition entre énantiomères dans la synthèse des dilipides par RhlA, nous avons utilisé des substrats possédant la même chiralité que celle des rhamnolipides, de la même façon que Burger, Glaser et Burton (1962 ; 1963) ont synthétisé leur 3-¹⁴C-hydroxydécanoyl-CoA à partir des acides 3-¹⁴C-hydroxydécanoïque issus d'une hydrolyse acide des ¹⁴C-rhamnolipides produits par une culture de *P. aeruginosa* ayant pour seule source de carbone de l'acétate-¹⁴C. On peut donc penser que Zhu et Rock (2008) ont échoué dans leur tentative de produire des dilipides radioactifs à partir du 3-hydroxyacyl-CoA parce que celui-ci était racémique, l'autre isomère optique inhibant la réaction de couplage. Si cela est juste, alors RhlA présente une spécificité chirale pour son substrat.

4.4.5 Un site actif potentiel pour RhlA

Au vu des travaux que nous avons effectués, nous ne pouvons présenter que des résultats préliminaires quant à l'éventuelle localisation du site actif de RhlA.

Tout d'abord, nous devons préciser qu'un des points faibles de cette étude aura été l'impossibilité de faire une analyse protéomique de la protéine recombinante purifiée en condition native. En effet, lors de cette purification, l'élution de la protéine dépend d'un gradient d'imidazole (Fig. 4.3). Or l'imidazole est un composé incompatible avec les analyses par spectrométrie de masse. Malheureusement, toutes les tentatives d'élimination de l'imidazole par dialyse et de gel de filtration ont échoué, pour des raisons que l'on n'arrive pas à expliquer.

Cependant, lors des analyses peptidiques de RhlA après digestion à la trypsine dans le gel de polyacrylamide, une séquence animée a été mise en avant et pourrait être impliquée dans le site actif de l'enzyme (Fig. 4.21; 4.22 et 4.23). En effet le peptide ASNHQHMASLATGEYEQAR (séquence soulignée dans la figure 4.20) a été séquencé trois fois dans le même échantillon, mais évalué, au final, avec deux poids moléculaires différents (2 100 Daltons chargé 3 et 4 fois et 2 374 Daltons chargé 4 fois), indiquant la présence d'une structure non protéique faisant 274 Daltons et dont on ne connaît pas la nature. En effet grâce à l'accumulation, par le logiciel Analyst, des ions détectés par spectrométrie de masse, on a été capable d'observer deux ions pseudomoléculaires à des valeurs de m/z 526 et 594 (Fig. 4.21) qui présentent le

même spectre de masse après fragmentation par gaz de collision (Fig. 4.22A-B), mettant ainsi en avant la même séquence peptidique partielle (Fig. 4.22-C). L'analyse SM/SM de l'ion 701 présente aussi le même spectre de masse, mais toutefois de façon plus complète que les précédents. En fait, pour déterminer la séquence peptidique des ions 526 et 594 ce sont essentiellement les ions de la fragmentation de la série-y qui sont utilisés (Fig. 4.21, 4.25 et 4.26). Or le logiciel Analyst est aussi capable de détecter sur les spectres de masse présentés les ions des séries a, b et immonium pour déduire et compléter la séquence peptidique et c'est exactement ce qui a été fait pour l'ion 701 (Fig. 4.23, et 4.24).

Bien que cette observation n'ait pu être faite qu'une seule fois, on peut supposer que la masse de 274 corresponde à une ou plusieurs modifications post-traductionnelles sur ce peptide. En s'aidant d'une base de données résumant toutes les modifications post-traductionnelles connues en fonction des changements de masse (Delta Mass Database) qu'elles engendrent, nous n'avons pas pu déterminer à quoi pourrait correspondre cette masse de 274. Cependant on peut aussi s'attendre à ce que cette valeur soit la résultante d'une combinaison de différentes modifications post-traductionnelles. En effet sur la séquence identifiée, il existe plusieurs acides aminés susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles. Par exemple, les deux sérines (S), la thréonine (T), la tyrosine (Y) et les deux histidines (H) peuvent être phosphorylées. Une phosphorylation entraîne un changement de masse de 80. De plus la lysine (K) et l'arginine (R) peuvent aussi être méthylées sachant que cela engendre un changement de masse de 14. Aussi un changement de masse de 162 peut être apporté par une O-glycosylation sur une des deux sérines ou la thréonine. Mais lorsque l'on analyse la séquence peptidique entière de RhIA dans Prosite (ScanProsite Server), aucun site de modification post-traductionnelle n'est détecté sur un des acides aminés du peptide séquencé.

En fin de compte, on pourrait mieux évaluer la localisation potentielle du site actif de RhIA en ayant la possibilité de purifier la protéine sans agents incompatibles pour les analyses protéomiques par spectrométrie de masse. Par exemple le système TAP présente un système de purification en tandem très intéressant qui permet de faire éluer la protéine recombinante sous sa forme native dans une solution d'EGTA (acide éthylène glycol tétraacétique) (Puig *et al.*, 2001).

CHAPITRE 4

Production de mono-rhamnolipides chez *E. coli* et les spécificités enzymatiques de RhlA

5.1 OBJECTIFS

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de recherche du Dr. Gloria Soberon Chavez et qui a donné lieu à une publication (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Le but de cette étude est de produire des mono-rhamnolipides chez *E. coli* W3110 en présence de l'opéron *rhlAB* combiné ou non à la présence de l'opéron *rmlBDAC* responsable de la production de dDTP-L-rhamnose chez *P. aeruginosa* afin d'augmenter la production de biosurfactants mais aussi de déterminer le rôle de RhlA dans la production des biosurfactants et dans l'arrangement des chaînes hydrocarbonées des dilipides et des rhamnolipides. En effet, à l'intérieur d'un ensemble de composés isomériques, lorsque les deux chaînes hydrocarbonées sont de longueurs différentes, les isomères ayant la chaîne adjacente au premier rhamnose plus petite que l'autre sont toujours majoritaires (Figure 5.1).

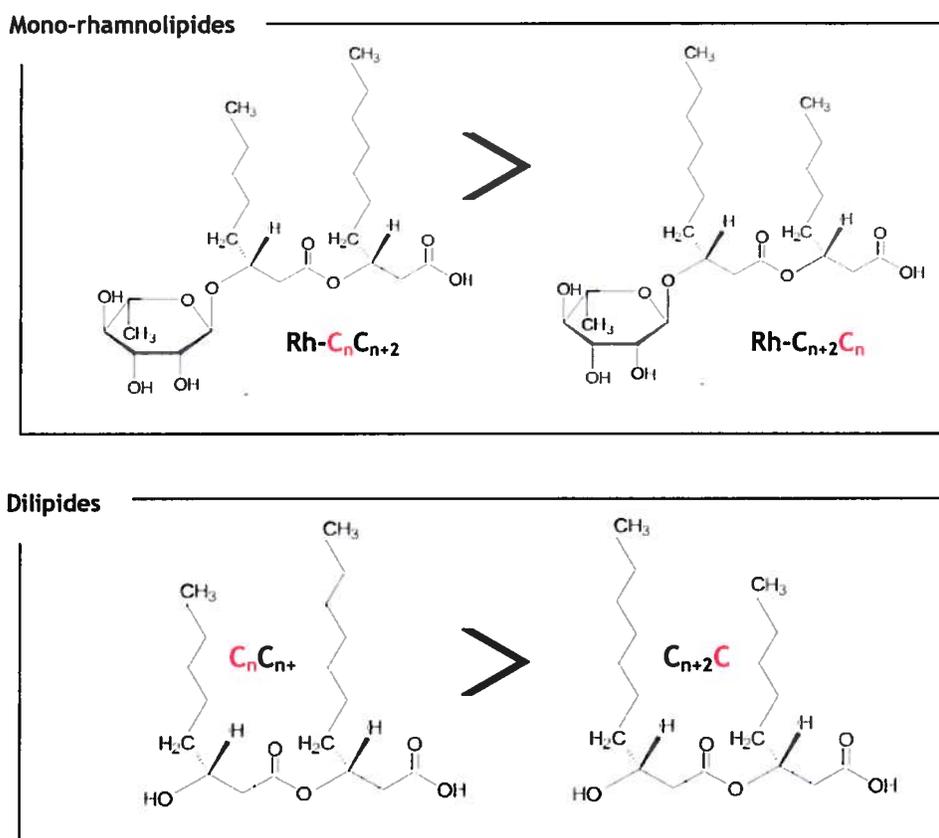


Figure 5.1 -Structure des arrangements des chaînes hydrocarbonées des mono-rhamnolipides et des dilipides. $n = 8$ ou 10 . Le signe $>$ entre les deux composés indique que l'un des congénères est plus abondant que l'autre.

Ce quatrième volet du projet présente les principaux résultats de cette étude en mettant l'accent sur les résultats issus de notre participation, qui a été principalement d'analyser par CL/SM la production des rhamnolipides et des dilipides, ainsi que leur caractérisation.

5.2 METHODOLOGIE

5.2.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches PA01 et *E. coli* W3110 ont été fournies par le Dr. Gloria Soberón-Chávez (Département de Biologie Moléculaire et Biotechnologie, Institut d'Investigations Biomédicales, Mexico, Mexique). Les vecteurs pNC46 et pINC94 ont été construits par l'équipe du Dr. Gloria Soberón-Chávez (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Le cosmide pNC46 dérivé du plasmide pCP13, contient un fragment de 22 kb de *P. aeruginosa* incluant l'opéron *rmlBDAC* et un gène de résistance à la tétracycline. Le vecteur pINC94 (Le Borgne *et al.*, 1998), dérivé du plasmide pBRINTs-Cat2, comprend un gène qui confère une résistance au chloramphénicol, un promoteur *Plac* et l'opéron *rhlAB*.

5.2.2 Conditions de culture

Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu minimal M9 avec 0.5 % de glucose comme source de carbone pendant 48 h à 30°C.

5.2.3 Analyses des biosurfactants par spectrométrie de masse

Les mono-rhamnolipides et les dilipides ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse selon les paramètres déjà décrits précédemment (Chapitre 3).

5.3 RESULTATS

Tableau 5.1 - Suivis au cours du temps de la production des dilipides et des rhamnolipides (Rhl) ($\mu\text{g/ml}$) par les souches *E. coli* W3110 contenant différents plasmides et *P. aeruginosa* PAO1. Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu minimal M9 avec 0.5 % de glucose comme source de carbone pour 48 h à 30°C.

Temps	pINC94		pINC94/pNC46		PAO1	
	Rhl	Dilipides*	Rhl	Dilipides*	Rhl**	Dilipides
24 h	15.6	1.16	70.5	9.4	206	21.3
48 h	65.7	3.70	120.6	9.7	227	23.4

* Le seul dilipide détecté dans les cultures de *E. coli* est le $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$.

** Les rhamnolipides détectés chez PAO1 comprennent les mono et les di-rhamnolipides.

Le tableau 5.1 montre qu'il est possible de produire des mono-rhamnolipides et des dilipides chez *E. coli* W3110. La production de biosurfactants incluant les dilipides est même presque doublée au bout de 48 h en présence de l'opéron *rmIBDAC* (pNC46) responsable de la production de dDTP-L-rhamnose. D'après ces résultats, on peut aussi déduire qu'une augmentation de la production en rhamnolipides stimule la production de dilipides et donc l'activité enzymatique de RhlA. La production significativement plus importante chez PAO1 s'explique par le fait que les rhamnolipides analysées comprennent les mono et les di-rhamnolipides mélangés.

Tableau 5.2 - Profil de production de mono-rhamnolipides ($\mu\text{g/ml}$) par les souches *E. coli* W3110 contenant différents plasmides et *P. aeruginosa* PAO1. Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu minimal M9 avec 0.5 % de glucose comme source de carbone à 30°C.

Souches	Familles de mono-rhamnolipides produits en $\mu\text{g/ml}$ (%)				
	Rhl- C_8C_{10}	Rhl- $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$	Rhl- $\text{C}_{10}\text{C}_{12:1}$	Rhl- $\text{C}_{10}\text{C}_{12}$	Total
pINC94	5.10 (7.7)	50.68 (77.1)	3.22 (4.9)	6.71 (10.2)	65.7 (100)
pINC94/pNC46	14.24 (11.8)	87.19 (72.2)	6.16 (5.1)	13.08 (10.8)	120.6 (100)
PAO1	3.86 (8.2)	34.86 (75.2)	3.72 (8.0)	4.08 (9.0)	46.46 (100)

Le tableau 5.2 complète l'information précédente en montrant que les profils de production, dans les familles de mono-rhamnolipides, sont proportionnellement similaires chez W3110 et

PAO1. Le mono-rhamnolipide le plus abondant dans tous les cas reste le RC₁₀C₁₀ avec 75.2 à 77.1 % de la production.

Par la suite on a tenté de déterminer si la régiospécificité des rhamnolipides et des dilipides est due à RhlA ou à RhlB. En effet RhlA pourrait produire uniformément les deux types d'arrangement et ensuite RhlB agirait avec plus d'affinité sur les dilipides qui présentent une chaîne hydrocarbonée plus courte du côté hydroxy- terminal. Pour clarifier cela, les dilipides et les mono-rhamnolipides produits ont été fragmentés par CL/SM/SM. En fonction des ions pseudomoléculaires filles obtenues le type d'arrangement est déterminé.

Tableau 5.3 - Profil des ratios des différentes paires isomériques de monorhamnolipides et de dilipides produits par les souches *E. coli* W3110, BL21(DE3) et *P. aeruginosa* 57RP.

Souches	Biosurfactants analysés	Arrangement des chaînes hydrocarbonées					
		C ₈ C ₁₀	C ₁₀ C ₈	C ₁₀ C _{12:1}	C _{12:1} C ₁₀	C ₁₀ C ₁₂	C ₁₂ C ₁₀
57RP	Mono-Rhamnolipides	10	5	10	0.1	10	4
W3110 - pINC94	Mono-Rhamnolipides	10	5	10	0	10	2
W3110 - pINC94/pNC46	Mono-Rhamnolipides	10	7	10	0	10	3
BL21(DE3) - pAPR3	Dilipides	10	7.8	10	0	10	3

Le tableau 5.3 démontre que BL21(DE3)(pAPR3), qui exprime RhlA, produit des paires isomériques de dilipides (Fig. 5.1) dans les mêmes proportions que celles observées dans les mono-rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* 57RP et les souches W3110 qui expriment RhlB.

5.4 SPECIFICITES DE RhIA : LONGUEUR ET ARRANGEMENT DES CHAINES HYDROCARBONEES

Bien qu'il existe plus d'une trentaine de composés différents dans la famille des rhamnolipides (Déziel *et al.*, 2000 ; 2003 et Lépine *et al.*, 2002), sans oublier les rhamnolipides qui ne présentent qu'une seule chaîne aliphatique (Syldakt *et al.* 1985), il a toujours été observé que les rhamnolipides RRC₁₀C₁₀, RC₁₀C₁₀ et les dilipides C₁₀C₁₀ sont identifiés comme étant les composés majoritaires. Lorsque *rhIA* est exprimée chez *E. coli*, la composition des dilipides produits reste similaire à celle observée chez *P. aeruginosa* (Tab. 5.2) avec comme composé majoritaire le dilipide C₁₀C₁₀. De plus, on constate que cette répartition est caractéristique des rhamnolipides et des dilipides indépendamment des milieux de culture et la source de carbone utilisés. En effet le profil de production de mono-rhamnolipides par les souches *E. coli* W3110 en milieu Minimal M9 avec 0.5 % de glucose (Tab. 5.2) est comparable à celui observé chez BL21(DE3)(pAPR3) en milieu minimal M9 avec 0.5 % d'acétate (Fig. 4.12). Il en est de même chez *P. aeruginosa* quelque soit la nature des sources de carbone utilisées, qui pourtant influencent grandement le taux de production des rhamnolipides et des dilipides (Fig. 2.2, 2.3, 2.5 ; Nitschke, Costa et Contiero, 2005). Ainsi, on constate que la source de carbone n'a que peu d'impact sur la composition de cette famille de biosurfactants.

Les profils de production que nous avons analysés dans cette étude, en combinaison avec nos propres analyses sur BL21(DE3)(pAPR3) démontrent que c'est RhIA qui détermine la composition des rhamnolipides et des dilipides de part son affinité préférentielle avec les 3-hydroxyesters en C₁₀. Zhu et Rock (2008) ont d'ailleurs démontré que RhIA a plus d'affinité pour les 3-hydroxydécanyol-ACP que pour les 3-hydroxyoctanyol-ACP et 3-hydroxydodécanyol-ACP. C'est donc l'affinité vis-à-vis du substrat de RhIA qui détermine la composition de la portion 3-hydroxyacide des dilipides et des rhamnolipides et non pas la quantité relative des différents 3-hydroxyacides présents dans la cellule, à moins que le profil de ces composés ne soit le même entre *E. coli* et *P. aeruginosa*, ce qui semble peu probable.

Une autre particularité de la famille des rhamnolipides est que pour tous les composés qui présentent deux chaînes hydrocarbonées de longueurs différentes (Fig. 5.1), les isomères ayant la plus petite chaîne adjacente au premier rhamnose sont toujours les plus abondants (Déziel *et al.*, 2000). L'expression de RhIA dans des hôtes hétérologues *E. coli* BL21(DE3) et W3110, nous permet de retrouver la même règle d'arrangement des chaînes hydrocarbonées

chez les dilipides produits (Tab. 5.3), ce qui confirme que la régiospécificité des dilipides et des rhamnolipides, est de la responsabilité de RhlA uniquement et n'est donc pas due à l'activité de RhlB.

Ainsi, nos travaux confirment que RhlA est l'enzyme responsable d'une part de la sélectivité régissant la longueur des chaînes hydrocarbonées retrouvées dans les rhamnolipides et d'autre part de la régiospécificité dans l'arrangement des chaînes hydrocarbonées hétérologues des dilipides et des rhamnolipides.

Aussi dans cette étude nos travaux d'analyse ont permis de mettre en évidence qu'il existe une corrélation entre l'activité de RhlB, les dDTP-L-rhamnose et l'activité de RhlA (Tab. 5.1). En effet en présence de l'opéron *rmIBDAC* la production de dilipides augmente significativement, alors que RhlA n'utilise pas de rhamnose comme substrat. C'est la rhamnosyltransferase RhlB qui catalyse le transfert des dDTP-L-rhamnoses sur les dilipides produits par RhlA, pour produire des mono-rhamnolipides. Il est donc possible que les rhamnolipides modulent l'activité de RhlA. Deux hypothèses mériteraient d'être vérifiées dans l'avenir, soit la possibilité que les rhamnolipides activent l'expression de *rhlA* ou qu'ils agissent de façon post-traductionnelle sur RhlA. La modification observée de 274 Da sur un peptide tryptique de RhlA, telle que mentionnée précédemment, pourrait être compatible avec cette dernière hypothèse, bien que nous n'avons pas pu corrélérer une augmentation de 274 Da avec la masse d'un rhamnolipide ou d'un dérivé de rhamnolipides.

CHAPITRE 5

Propriétés physiologiques des biosurfactants

6.1 OBJECTIFS

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Déziel, et a donné lieu à une publication (Tremblay *et al.*, 2007). Le but de cette étude est de démontrer le rôle physiologique des biosurfactants dans la mobilité swarming chez *P. aeruginosa*.

Bien que les rhamnolipides aient été intensivement étudiés, leur rôle physiologique chez *P. aeruginosa* reste mal défini (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). En effet, les rhamnolipides sont reconnus pour augmenter la biodisponibilité des substrats hydrophobes, pour leurs activités antibiotiques et pour leur contribution à la pathogénicité de *P. aeruginosa* en tant que facteur de virulence (Itoh et Suzuki, 1972; Lang et Wagner, 1993; McClure et Schiller, 1996, Jensen *et al.*, 2007). De plus, les rhamnolipides régulent le développement des biofilms (Davey *et al.*, 2003; Schooling *et al.*, 2004; Boles *et al.*, 2005; Lequette et Greenberg, 2005; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). Plusieurs études ont récemment démontré que les dilipides étaient indispensables au mode de mobilité swarming chez *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005). Le swarming est un des trois modes de mobilité multicellulaire organisée dont *P. aeruginosa* est capable. C'est un mode de mobilité qui se manifeste sur des surfaces semi-solides (i.e. 0.5% d'agar) et qui requière l'utilisation du flagelle et du pili de type IV (Köhler *et al.* 2000; Rashid et Kornberg 2000 ; Déziel, Comeau et Villemur, 2001).

Dans l'étude de Tremblay *et al.* (2007) l'effet de chacune des sous-familles des rhamnolipides (di-rhamnolipides, mono-rhamnolipides et dilipides) a été testé pour sa capacité à moduler le swarming. Dans ce volet, seuls les résultats qui découlent de notre implication dans cette collaboration seront présentés et discutés. En effet dans cette étude la souche BL21(DE3)(pAPR3), capable de produire des dilipides (Fig. 3.15) a été utilisée et étudiée afin de mettre en évidence le rôle physiologique des dilipides dans le swarming de *P. aeruginosa*. De plus, dans cette étude nous avons effectué toutes les analyses CL/SM des biosurfactants.

6.2 METHODOLOGIE

6.2.1 Les souches bactériennes

Les souche BL21(DE3)(pUCP18) et BL21(DE3)(pAPR3) utilisées dans cette étude ont été construites dans le cadre de ce projet de recherche selon la méthodologie présentée ultérieurement (Chapitre 3). La souche sauvage PA14 est une souche fournie par le laboratoire du Dr. Déziel (INRS-IAF).

6.2.2 Le milieu de culture et les conditions de croissance

Les cultures cellulaires en milieu liquide se font à 37°C en milieu TSB sur un agitateur rotatif. Le milieu de culture solide utilisé pour les tests de swarming est un milieu minimal M9 modifié contenant 0.5% d'agar (Tremblay et al. 2007).

6.2.3 Test de swarming

Les géloses sont inoculées avec des cultures bactériennes d'une DO_{600nm} variant de 3.0 à 5.0. De façon diamétralement opposée, 5 μ l de PA14 sont déposés d'un côté de la gélose de swarming et 5 μ l d'*E. coli* exprimant ou non rhlA sont étalées selon un trait vertical de l'autre côté de la même gélose. Les géloses sont incubées à 30°C pendant 16h. Chaque condition est testée cinq fois.

6.2.4 Diffusion des biosurfactants

Un disque en papier stérile de 6mm de diamètre (Becton-Dickinson) est imprégné de 80 μ g de di-RLs et de 80 μ g de HAAs. Les dirhamnolipides ont été préalablement extraits et purifiés à partir d'une culture de PA14, alors que les HAAs sont obtenus à partir d'une hydrolyse acide des rhamnolipides (Tremblay *et al.*, 2007). Après 15 minutes d'incubation à 30°C, des échantillons de gélose sont prélevés à intervalle régulier depuis le point d'origine, à l'aide d'un poinçon de 0.5 cm de diamètre. Pour chaque distance depuis le point d'origine, 4

échantillons sont prélevés et regroupés dans un tube contenant 1 ml de KHCO_3 à 1 % (pH 9.0). Les échantillons sont vortexés et incubés à la température de la pièce pendant 2 heures. Le pH est ajusté à 4.0 avec du HCl concentré et la solution est extraite trois fois avec 500 μl d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont regroupées et évaporées sous jet d'azote. Les résidus sont resuspendus dans une solution d'acétonitrile à 36 % contenant 4 mM d'acétate d'ammonium.

6.2.5 Analyse des biosurfactants

Les biosurfactants sont analysés par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse dans les conditions préalablement décrites dans ce projet (Chapitre 3).

6.3 RESULTATS

Afin de confirmer les tests de swarming présentés dans la première partie de l'étude de Tremblay *et al.* (2007), et qui démontrent que les dirhamnolipides stimulent la formation et attire les dendrites en swarming alors que les dilipides les inhibent et les repoussent, un test de swarming en présence d'une production hétérologue de dilipides a été effectué.

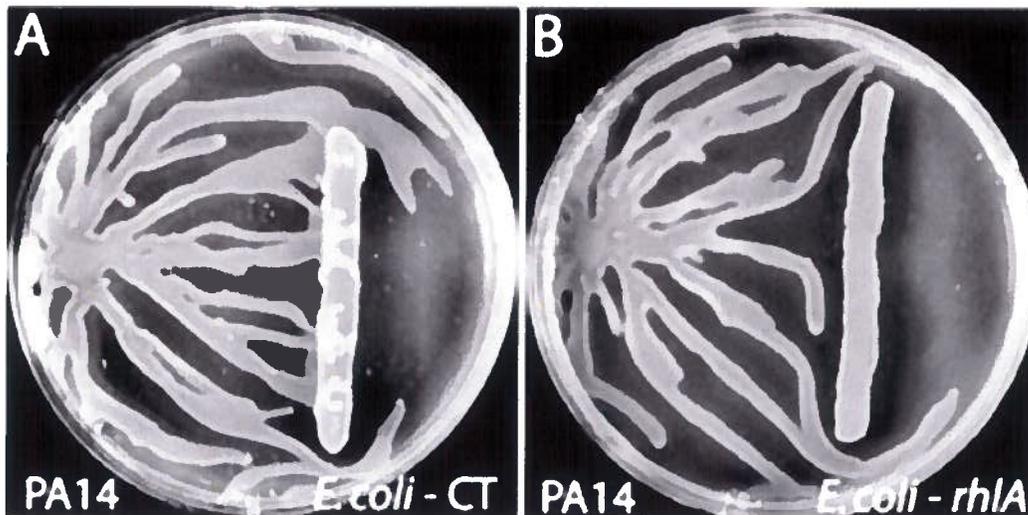


Figure 6.1 - Effet chémorépulseur des dilipides produits par *E. coli* sur les dendrites du swarming de *P. aeruginosa*. A- la migration des dendrites du swarming de PA14 n'est pas affectée par la souche d'*E. coli* porteuse du plasmide pUCP18 (*E. coli*-CT). B- La migration des dendrites du swarming de PA14 est déviée par la présence d'*E. coli* exprimant *rhIA* et qui produit des dilipides (*E. coli*-*rhIA*).

Par la figure 6.1-A on démontre que la migration des dendrites du swarming de PA14 n'est pas affectée par la souche d'*E. coli* porteuse du plasmide pUCP18 et non productrice de dilipides. En effet les dendrites de PA14 traversent l'inoculum de la souche d'*E. coli* sans que leur trajectoire ne soit déviée. Par contre par la figure 6.1-B on démontre que la production de dilipides par la souche BL21(DE3)(pAPR3) fait dévier la trajectoire des dendrites de PA14. On observe en effet que les dendrites contournent de part et d'autre la bande d'*E. coli* productrice de dilipides. Ceci confirme que les dilipides ont un effet chémo-répulseur sur la mobilité en swarming de *P. aeruginosa*. De plus les analyses CLSM ont démontré que les deux souches ont des productions de dilipides comparables. En effet après 16h d'agitation en milieu minimale M9 à 30°C, les souches BL21(DE3)(pAPR3) et PA14 ont produit respectivement, $2.87 \pm 0.83 \mu\text{M}$ et $1.33 \pm 0.27 \mu\text{M}$ de dilipides.

Afin de mieux comprendre comment les rhamnolipides et les dilipides qui ont des effets chimiotactiques opposés sont impliqués dans le swarming alors que *P. aeruginosa* produit elle-même ces deux composés, leur solubilité et leur pouvoir de diffusion dans l'agar semi-solide ont été analysés.

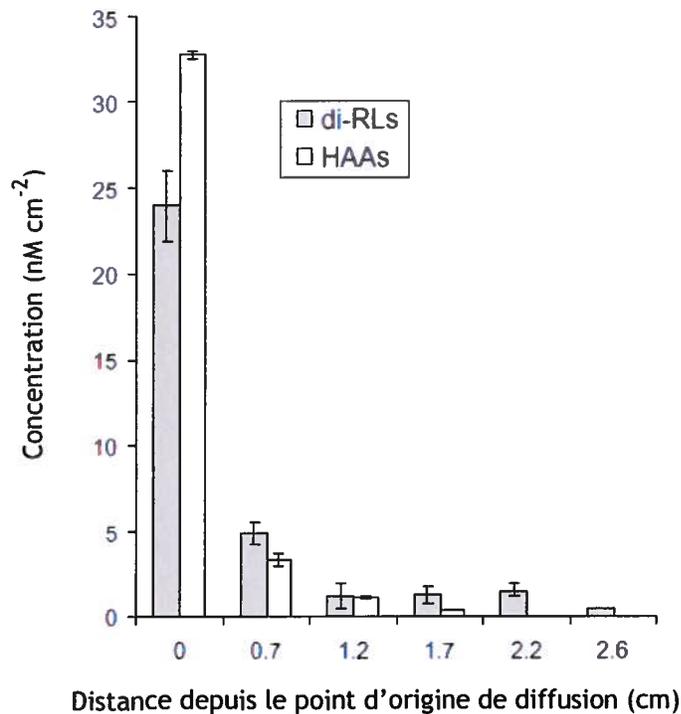


Figure 6.2 -Les di-rhamnolipides (di-RLs) diffusent plus rapidement que les dilipides (HAAs). Les disques imprégnés de di-RLs et de HAAs sont placés sur les géloses et laissés pendant 15 minutes. Ensuite les biosurfactants sont extraits de la gélose et différents points de distance du point d'origine de diffusion et sont analysés par CL/SM.

La figure 6.2 démontre que les dilipides et les di-rhamnolipides ne diffusent pas dans la gélose à la même vitesse. En effet, les dilipides diffusent moins rapidement que les di-rhamnolipides. Alors que les dilipides sont les composés majoritaires au point de départ (0 cm) après 15 min de diffusion, on constate que 7 mm plus loin, ce sont les di-rhamnolipides qui sont les composés majoritaires. De plus, après 1.7 cm, seuls les di-rhamnolipides sont détectés dans la gélose. Ainsi on démontre que les dilipides migrent moins facilement dans la gélose que les di-rhamnolipides.

6.4 PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DES DILIPIDES ET DES RHAMNOLIPIDES

Parallèlement au projet de caractérisation enzymatique de RhlA, la souche BL21(DE3)(pAPR3), capable de produire des dilipides (Fig. 3.15) a été étudiée afin de mettre en évidence le rôle des dilipides dans le swarming de *P. aeruginosa* (Tremblay *et al.* 2007). Dans cette étude qui a fait l'objet d'une publication, nous avons effectué toutes les analyses CL/SM des biosurfactants et nous avons aussi construit et fournit la souche BL21(DE3)(pAPR3).

Chacune des sous-familles des rhamnolipides (di-rhamnolipides, mono-rhamnolipides et dilipides) a été testée pour sa capacité à moduler le swarming. Il en résulte que les di-rhamnolipides ont un effet attractif sur les cellules, alors que les dilipides ont un effet répulsif. Ainsi les dilipides sont capables d'inhiber ce type de mobilité cellulaire alors que les di-rhamnolipides le stimulent. En plaçant la souche BL21(DE3)(pAPR3) face à la souche sauvage PA14, il a été observé que les dendrites du swarming de PA14 évitaient de rentrer en contact avec la souche d'*E. coli* capable de produire des dilipides alors que les dendrites traversent la souche d'*E. coli* non-productrice de dilipides. Les mono-rhamnolipides n'auraient pas d'effet chimiotactique et auraient simplement un rôle d'agent mouillant.

De plus lors de cette étude, il a été mis en évidence que les dilipides et les di-rhamnolipides diffusaient différemment à travers la gélose semi-solide. En effet, les dilipides diffusent plus lentement que les di-rhamnolipides et ce, à cause de leurs propriétés chimiques différentes, les dilipides étant moins solubles dans l'eau que les di-rhamnolipides. Et c'est la combinaison de ces deux propriétés (chémo-attraction et solubilité) qui permettrait d'expliquer comment les dendrites se forment lors d'un déplacement en swarming sur une gélose semi-solide (Tremblay *et al.* 2007). Grâce à ces résultats, Tremblay *et al.* (2007) ont proposé un modèle de développement des dendrites lors d'un swarming de *P. aeruginosa*. (Figure 6.3).

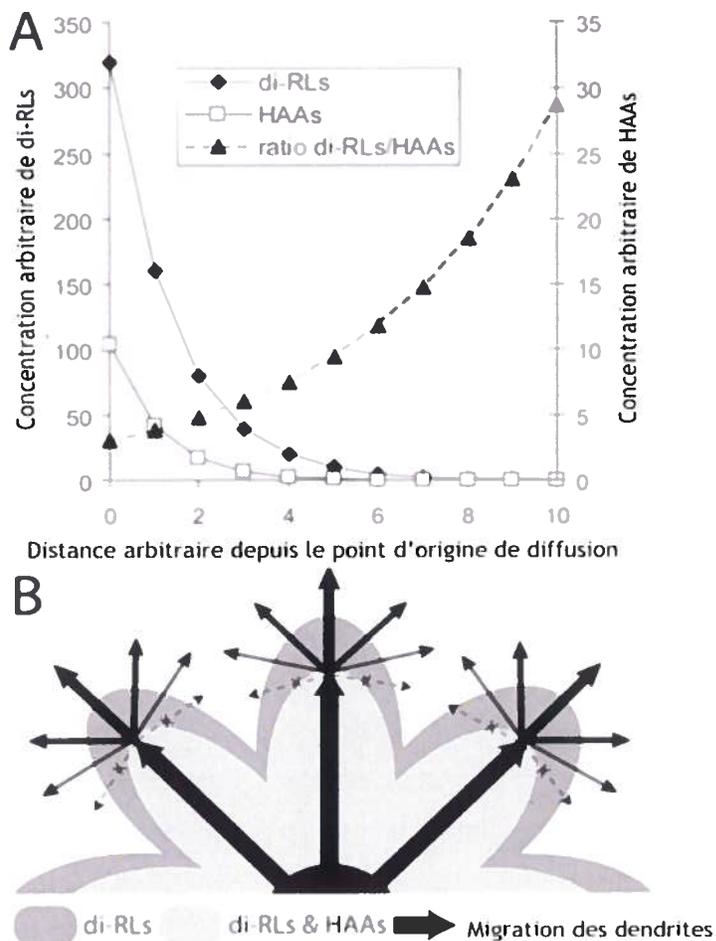


Figure 6.3 - Proposition d'un modèle de mobilité swarming chez *P. aeruginosa*. A- Modèle de diffusion des di-rhamnolipides (di-RLs) et des dilipides (HAAs) à travers une gélose semi-solide (0.5% d'agar). B- Modèle de formation des dendrites lors d'un swarming de *P. aeruginosa*.

Ainsi, par ce que dans une gélose semi-solide les di-rhamnolipides (di-RLs) diffusent plus vite que les dilipides (HAAs) depuis le point d'origine de diffusion, cela crée un gradient croissant du quotient di-RLs/HAAs permettant aux di-rhamnolipides d'exercer pleinement leur effet chemoattracteur à partir d'un certain seuil. Donc les cellules situées sur la ligne de front du swarming sont à la fois attirées par les di-RLs qui diffusent rapidement et repoussées par les HAAs qui tardent à s'éloigner de leur source de production. C'est ainsi que les cellules migrent vers l'extérieur en réponse à ces deux forces, tout en suivant le gradient croissant du ratio di-RLs/HAAs. Par ce mécanisme on comprend aussi que les dendrites n'entrent jamais en contact les unes avec les autres par ce que les zones à forte densité cellulaires sont enrichies en HAAs chémorépulsifs. De plus, cela explique aussi que les dendrites ont tendance à se ramifier au lieu de s'élargir, à mesure qu'elles s'éloignent du point d'origine.

Discussion générale

Alors que nous avons observé une faible production de dilipides en utilisant le L-3-hydroxyacyl-CoA comme substrat de RhIA à la toute fin de ce projet, Zhu et Rock (2008) ont démontré que RhIA produit des dilipides directement à partir des 3-hydroxyacyl-ACP issus de la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras et ce, sans passer par un intermédiaire hydroxyacyl-CoA. Cependant nos tests effectués à partir du C₁₀ACP n'ont rien démontré de tel (Fig. 4.15). Plusieurs arguments peuvent expliquer les différences dans nos résultats et ceux de Zhu et Rock (2008). En effet, la synthèse des substrats n'a pas été effectuée de la même manière.

Premièrement, l'hydroxyacyl-ACP utilisé comme substrat par l'équipe de Zhu et Rock (2008) a été synthétisé par réaction enzymatique via les enzymes FabG et FabH préalablement purifiées ainsi qu'avec de l'ACP extrait et purifié à partir de *P. aeruginosa*. Cependant, dans notre projet, l'hydroxyacyl-ACP a été synthétisé chimiquement à partir de l'ACP d'*E. coli* et d'acide 3-hydroxydécanoïque provenant de l'hydrolyse des rhamnolipides produits par *P. aeruginosa*, c'est-à-dire en activant la fonction acyle en une fonction acylimidazole et la faisant réagir avec l'ACP. Le couplage de l'acide 3-hydroxydécanoïque avec l'ACP a bien été confirmé par spectrométrie de masse. Cependant, cette méthode analytique n'indique pas si l'addition s'est bien faite sur la fonction thiol (normalement plus réactive) du bras phosphopantéthéine de l'ACP. En effet il est possible que le couplage se soit effectué avec un autre nucléophile de l'ACP (telle qu'une lysine par exemple) et que cela ait formé un hydroxyacyl-ACP non réactif. Ceci pourrait alors expliquer pourquoi nous n'avons pas réussi à observer les mêmes résultats que Zhu et Rock qui en effectuant la synthèse de façon enzymatique se sont assurés la synthèse d'un acyl-ACP adéquatement couplé sur le thiol de la fonction phosphopantéthéine et donc actif.

On pourrait aussi penser que l'ACP d'*E. coli* n'est pas compatible avec le site actif de la RhIA recombinante surexprimée et purifiée. Cependant cette hypothèse est peu probable, puisqu'il a été possible d'observer une production de dilipides à partir de la souche BL21(DE3)(pAPR3) (Fig. 4.9) ce qui démontre que les ACP d'*E. coli* permettraient bien la synthèse de dilipides avec le 3 hydroxyacyl-ACP comme substrat.

Deuxièmement, Zhu et Rock n'ont pas réussi à observer de production de dilipides à partir du 3-hydroxydécanoïl-CoA alors que nous avons observé une production, quoique faible, avec ce substrat. Il faut cependant noter que Zhu et Rock ont utilisé le mélange racémique d'acide 3-hydroxydécanoïque disponible commercialement dans leur synthèse chimique de leur 3-

hydroxydécanoyl-CoA. On ne peut donc pas exclure qu'un tel mélange racémique puisse nuire à la production de dilipides à un point tel qu'ils n'auraient pas pu observer la faible production de dilipides que nous avons détecté en utilisant un acide 3-hydroxydecanoïque optiquement pur.

La surproduction de rhamnolipides chez le mutant PA2871 (Fig. 4.13), appuyait également l'hypothèse que le 3-hydroxyacyl-CoA soit un substrat potentiel de RhIA. En effet la désactivation du gène « *tesB* like » chez *P. aeruginosa*, induit une surproduction des rhamnolipides qui pourrait s'expliquer par l'accumulation du 3-hydroxyacyl-CoA, substrat spécifique de cette hydroxyacyl-CoA thioesthérase. Or le 3-hydroxyacyl-CoA est aussi le substrat de PhaC, PHA synthétase, qui initie la voie de biosynthèse des PHA (Hoffmann *et al.*, 2002 ; Park et Lee, 2002 et Langenbach, Rehm et Steinbüchel, 1997). Sabirova *et al.* (2006) ont clairement démontré qu'une mutation de cette hydroxyacyl-CoA thioesthérase augmentait la production des PHA. Bien que ce soit chez *Alcanivorax borkumensis*, on peut penser que cette mutation a les mêmes effets chez *P. aeruginosa*, mettant ainsi en compétition la biosynthèse des PHA avec celle des rhamnolipides. Plusieurs auteurs ont évoqué la possibilité d'un lien métabolique entre ces deux voies de biosynthèse (Campos-Garcia *et al.*, 1998 ; Rehm, Kruger et Steinbüchel, 1998 ; Rehm, Mitsky et Steinbüchel, 2001). En étudiant la production de rhamnolipides de la souche FRD1 de *P. aeruginosa* et de son triple mutant Δ *phaC1-Z-C2* incapable de produire des PHA, Pham *et al.* (2004) sont les seuls à avoir fait un lien direct entre une accumulation des 3-hydroxyacyl-CoA et la production des rhamnolipides. Les gènes *phaC1* et *phaC2* codent pour deux PHA synthétases (Timm et Steinbüchel, 1992) alors que le gène *phaZ* code pour une PHA dépolymérase intracellulaire (de Eugenio, 2007). En effet d'après l'étude de Pham *et al.* (2004), une inhibition de la voie de biosynthèse des PHA, entraîne une augmentation de la production des rhamnolipides de trois fois supérieure par rapport à la souche FRD1. Tous ces faits militent en faveur de l'hypothèse que les 3-hydroxyacyl-CoA initient aussi la voie de biosynthèse des rhamnolipides. Cependant on ne doit pas écarter l'hypothèse que la spécificité du gène « *tesB* like » ne se limite pas seulement aux hydroxyacyl-CoA, mais puisse aussi agir sur les hydroxyacyl-ACP.

De plus il est intéressant de noter que les 3-hydroxyacyl-CoA peuvent être obtenus par deux voies métaboliques différentes, via la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras via PhaG (Rehm, Mitsky et Steinbüchel, 2001), mais aussi via le cycle de β -oxydation des acyl-CoA (Ren, Witholt et Kessler, 2000 ; Sabirova *et al.*, 2006). Ainsi l'hypothèse que le 3-hydroxyacyl-CoA

soit le substrat central entre la voie métabolique des PHA et des rhamnolipides permet d'expliquer quelques phénomènes préalablement observés comme, par exemple, le fait que la production de rhamnolipides est plus importante en présence d'hydrocarbures qu'en présence de substrats hydrophiles telles que le glucose ou le mannitol comme seules sources de carbones (Nitschke, Costa et Contiero, 2005). En effet les chaînes hydrocarbonées sont métabolisées en alcanoyles activés en acyl-CoA, puis assimilées via le cycle terminal de β -oxydation. Il est également possible que le fait que les hydrocarbures contiennent une plus grande quantité de carbone qu'une quantité équivalente de glucides pourrait expliquer ce phénomène, compte tenu de la relativement haute teneur en carbone des hydrocarbures versus celle des glucides.

A défaut d'aller dans le sens des travaux de Zhu et Rock (2008), mais sans les contredire pour autant, nos résultats vont plutôt confirmer les travaux de Burger, Glaser et Burton (1962 ; 1963) qui déjà avaient démontré qu'en rajoutant du 3- 14 C-hydroxydécanyl-CoA dans un extrait cytoplasmique de *P. aeruginosa*, ils obtenaient des 14 C-rhamnolipides, indiquant ainsi clairement que l'hydroxyacyl-CoA était incorporé dans les rhamnolipides. Il est difficile de concilier ce résultat avec ceux de Zhu et Rock à moins d'évoquer un certain équilibre entre 3-hydroxyacyl-CoA et 3-hydroxyacyl-ACP.

D'ailleurs les résultats de Zhu et Rock (2008) pourraient être compatibles avec les nôtres dans la mesure où Zhu et Rock ont seulement démontré qu'ils ne détectaient pas de production de dilipides avec les 3-hydroxyacyl-CoA en présence d'une concentration de RhIA purifiée 10 fois plus importante que celle avec laquelle ils observaient une production « robuste » de dilipides. Il est tout à fait possible que notre méthode analytique (LC/MS) soit plus sensible que celle que Zhu et Rock ont utilisé et qui se faisait par chromatographie sur couche mince et détection au Phosphorimager de dilipides marqués radioactivement au 14 C. Il est donc possible que les 3-hydroxyacyl-CoA soient bien un substrat de RhIA, mais que cette enzyme préfère les 3-hydroxyacyl-ACP comme substrat dans la synthèse des dilipides.

Compte tenu de nos résultats ainsi que ceux de Zhu et Rock (2008) nous proposons un nouveau modèle pour la voie de biosynthèse des dilipides (Fig. 7.1). C'est un modèle qui n'exclut pas le fait que les 3-hydroxyacyl-CoA soient des substrats de RhIA pour produire des dilipides. Ainsi les 3-hydroxyacyl-CoA joueraient un rôle central entre les deux voies de biosynthèse des PHA et de rhamnolipides. Rappelons que nos résultats sont préliminaires et qu'ils nécessitent

des expériences supplémentaires pour éclaircir le véritable statut des 3-hydroxyacyl-CoA dans la voie de biosynthèse des dilipides et des rhamnolipides.

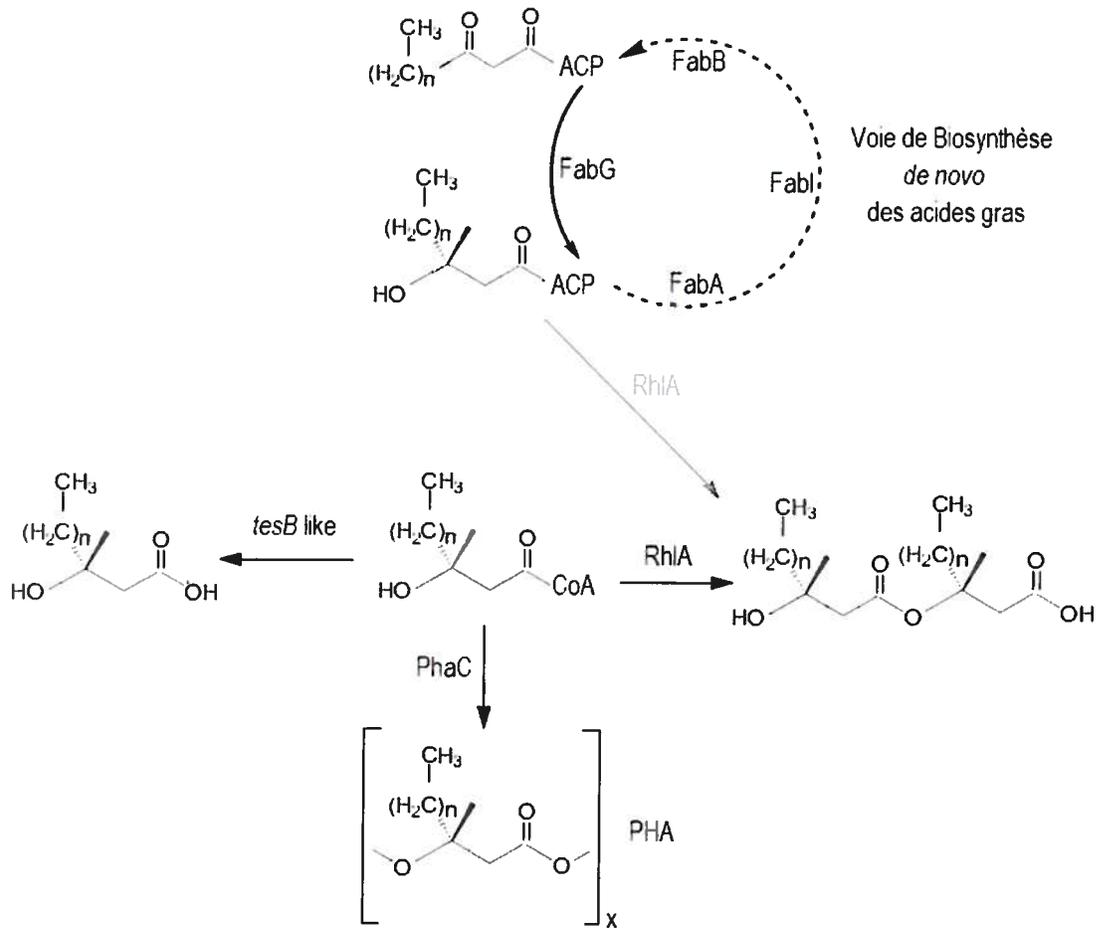


Figure 7.1 - Modèle proposé pour la voie de biosynthèse des dilipides chez *Pseudomonas aeruginosa*. Inspiré de Zhu et Rock 2008.

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce projet était de déterminer la fonction enzymatique de RhlA impliqué dans la voie de biosynthèse des biosurfactants produits par *P. aeruginosa*.

Au cours de ce projet nous avons pu optimiser le milieu minimal SW afin d'augmenter le rendement de production des rhamnolipides, en limitant l'apport en phosphate. Nous avons également varié les sources de carbone et d'azote sans amélioration notable des rendements. Il serait intéressant de tester le glycérol et l'huile d'olive, deux sources de carbone, respectivement hydrosoluble et liposoluble, qui pourraient peut-être améliorer la production des rhamnolipides.

Nous avons confirmé que les dilipides présentent des propriétés biosurfactantes plus intéressantes que les rhamnolipides. En effet, dans un premier temps, nous avons confirmé que les dilipides abaissent plus efficacement la tension de surface que ne le font les rhamnolipides. Ensuite, nous avons mis en évidence pour la première fois, que les dilipides ne forment que peu de mousse, même après une forte agitation, contrairement aux rhamnolipides, qui nécessitent souvent l'utilisation d'anti-mousse à l'échelle industrielle. De plus, en collaboration avec Julien Tremblay *et al.* (2007) nous avons pu mettre en évidence les premières propriétés physiologiques des dilipides. En effet les dilipides agissent comme des agents chémorépulseurs sur les cellules en swarming de *P. aeruginosa*, contrairement aux di-rhamnolipides qui sont des agents chémoattractifs. Ainsi, en combinaison avec les rhamnolipides, les dilipides joueraient alors un rôle dans l'orientation des dendrites formés lors du déplacement en swarming sur milieu semi-solide. Nous avons également observé que les dilipides produits par la souche d'*E. coli* BL21(DE3)(pAR3) présentent les mêmes propriétés que ceux produits et purifiés à partir de la souche de *P. aeruginosa* PA14.

Nous avons pu mettre en évidence que RhlA est une protéine cytoplasmique et non une protéine membranaire comme suggéré précédemment dans la littérature.

Nous avons réussi à produire une protéine recombinante fonctionnelle qui a permis de restaurer la production de dilipides chez la souche UO299, qui présente une mutation polaire dans le gène *rhlA* de l'opéron *rhlAB*. Ainsi à travers ce projet nous avons pu apporter une première évidence que RhlA est l'enzyme responsable de la production des dilipides, précurseurs des rhamnolipides et substrats de RhlB. Ce résultat a été

confirmé par la production de dilipides chez un hôte hétérologue, *E. coli* BL21(DE3)(pAPR3), qui exprime la protéine RhIA recombinante.

Une fois ce projet terminé, Zhu et Rock (2008) ont conclu que les substrats de RhIA pour produire des dilipides sont les 3-hydroxyacyl-ACP. Nos travaux permettent d'y ajouter de nouvelles perspectives. En effet, tous les tests enzymatiques que nous avons effectués, *in vivo* à partir des fractions cytoplasmiques et *in vitro* à partir de la protéine recombinante purifiée et isolée en condition native, ont démontré que les 3-hydroxyacyl-CoA pourraient aussi être des substrats potentiels de RhIA. Cependant nos résultats ne sont que préliminaires. En fait, nous soupçonnons que les différences de résultats que nous avons obtenus par rapport à Zhu et Rock (2008), pourraient être dues essentiellement à des façons différentes de synthétiser nos substrats. Ainsi il serait intéressant de tester notre substrat (le C₁₀CoA synthétisé chimiquement) selon leur protocole. Et inversement il serait intéressant de refaire nos tests enzymatiques avec notre protéine recombinante mais en utilisant le C10ACP synthétisé selon le protocole de Zhu et Rock (2008). C'est-à-dire de façon enzymatique et non de façon chimique comme nous l'avons fait.

Dans le cadre d'une seconde collaboration avec Cabrera-Valladares *et al.* (2006) nous avons établi que c'est RhIA qui est l'enzyme responsable d'une part de la sélectivité qui concerne la disparité hétérologue dans la longueur des chaînes hydrocarbonées retrouvées dans les dilipides et les rhamnolipides.

Des analyses protéomiques par spectrométrie de masse nous ont permis d'observer qu'un peptide tryptique de RhIA semblait être modifié post-traductionnellement. Il serait souhaitable de changer le protocole de purification de la protéine recombinante, de façon à éluer la protéine directement dans un tampon compatible avec les analyses CL/SM pour la détermination du poids moléculaire de RhIA de façon à confirmer ce dernier point. Nous pensons que le système TAP serait une bonne alternative à la méthode utilisant une séquence polyhistidine que nous avons utilisée dans ce travail.

Donc s'il devait y avoir une suite à ce projet, nous proposerions de repartir avec un nouveau protocole de purification en condition native qui visera *in fine* à pouvoir

analyser la protéine entière par spectrométrie de masse. Je suggérerais aussi de tester à nouveau les deux substrats, C10-CoA et C10-ACP, mais en utilisant le C10CoA synthétisé chimiquement comme nous l'avons fait lors de cette étude et en utilisant le C10ACP synthétisé de façon enzymatique telle que décrit par Zhu et Rock (2008).

Références

- Abalos A., Maximo F., Manresa M.A. et Bastida J. 2002. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**: 777-784.
- Ahimou F., Denis F.A, Touhami A. et Dufrêne Y.F. 2002. Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir* **18**: 9937-9941.
- Al-Tahhan R.M., Sandrin R., Bodour T.R. et Maier A.A. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3262-3268.
- Andrä J., Rademann J., Howe I., Koch M.H., Heine H., Zähringer U. et Brandenburg K. 2006. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *J. Biol. Chem.* **387**: 301-311.
- Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.-P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 162-168.
- Barbieri J.T. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 381-387.
- Baron S.S. et Rowe J.J. 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**: 814-820.
- Barrick D., Villanueva K., Childs J., Kalilo R., Thomas D.Schneiderl T., Lawrence C.E., Gold L. et Stormo G.D. 1994. Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Research.* **22**: 1287-1295.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 411-421.
- Bazire A., Dheilly A., Diab F., Morin D., Jebbar M., Haras D. et Dufour A. 2005. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and

rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**: 125-131.

Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G. et Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-95.

Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V. et Jadeja L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 279-313.

Boles B., Thoendel M. et Singh P. 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**: 1210-1223.

Brenner D.J., Staley J.T. et Krieg N.R. 2001. Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. dans Boon D.R., Castenholz R.W. et Garrity G.M. eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 1: New York, Springer-Verlag, p. 27-31.

Brooun A., Songhua Liu S. et Lewis K. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** : 640-646.

Burger M., Glaser L. et Burton R.M. 1962. The synthesis of a rhamnolipid by enzyme preparations from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta.* **56**: 172-174.

Burger M.M.; Glaser L. et. Burton R.M: 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **238**: 2595-2602.

Cabrera-Valladares, N., Richardson A.-P., Olvera C., Trevino L. G., Deziel E., Lepine F. et Soberon-Chavez G. 2006. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 187-194.

Caldwell D.E. 2002. The calculative nature of microbial biofilms and bioaggregates. *Int. Microbiol.* **5**: 107-116.

- Campos-Garcia J., Caro A.D., Najera R., Miller-Maier R.M., Al Tahhan R.A. et Soberon-Chavez G. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* **180**: 4442-4451.
- Caiazza N.C., Shanks R.M.Q. et O'Toole, G.A. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 7351-7361.
- Cha M., Lee N., Kim M., Kim M. et Lee S. 2007. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.* **99**:2192-2199.
- Chapon-Herve V., Akrim M., Latifi A., Williams P., Lazdunski A. et Bally M. 1997. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **24**: 1169-1178.
- Chayabutra C., Wu J. et Ju L.K. 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 25-33.
- Chen H., Bjercknes M, Kumar R. et Jay E. 1994. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4953-4957.
- Chen S.Y., Lu W.B., Wei Y.H., Chen W.M. et Chang J.S. 2007. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnol. Prog.* **23**: 661-666.
- Chen W. et Kuo T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic acids research* **21**: 2260.
- Choi J.H. et Lee S.Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 625-635.

- Christova N., Tuleva B., Lalchev Z., Jordanova A. et Jordanov B. 2004. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. *52*: 70-74.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. et Lappin-Scott H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-1322.
- Cox C.D. 1986. Role of Pyocyanin in the Acquisition of Iron from Transferrin. *Infection and Immunity.* **52**: 263-270,
- Cox C.D. et Parker J. 1979. Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 479-484.
- Cronan J.E. Jr. et Klages A.L. 1981. Chemical synthesis of acyl thioesters of acyl carrier protein with native structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5440-5444.
- Davey M.E. et O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
- Davey M.E., Caiazza N.M. et O'Toole G.A. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**: 1027-1036.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W. et Greenberg E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- de Eugenio L.I., Garcia P., Luengo J.M., Sanz J.M., Roman J.S., Garcia. J.L. et Prieto M.A. 2007. Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442 : Characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**: 4951-4962.
- de Kievit T.R. et Iglewski B.H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**: 4839-4849.

- Desai J.D. et Banat I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Déziel E., Comeau Y. et Villemur R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* **183**: 1195-1204.
- 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. *Biochim Biophys Acta* **1440**: 244-252.
- Déziel E., Lépine F., Milot S. et Villemur R. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta.* **1485**: 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**: 2005-2013.
- Déziel É., Paquette G., Villemur R., Lépine F. et Bisailon J.-G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1908-1912.
- Donlan R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.
- Drenkard E. et Ausubel F.M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* **416**: 740-743.
- Espinosa-Urgel M. 2003. Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J. Bacteriol.* **185**: 699-700.
- Evans L.R. et Linker A. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **116**: 915-924.

- Fabian T.C. 2000. Empiric therapy for pneumonia in the surgical intensive care unit. *Am. J. Surg.* 179: 18-23.
- Filloux A., Michel G. et Bally M..1998. GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 177-198.
- Fitzsimmons S.C. 1993. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr.* 122: 1-9.
- Frank L.H. et de Moss R.D. 1959. On the biosynthesis of pyocyanine. *J. Bacteriol.* 77: 776-782.
- Fuqua C., Parsek M.R. et Greenberg E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35: 439-468.
- Fuqua W.C., Winans S.C. et Greenberg E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 2796-2806.
- Fuqua W.C., Winans S.C. et Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.
- Ghigo J.M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 412: 442-445.
- Gibson R.L., Burns J.L. et Ramsey B.W. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 918-951.
- Govan J.R. et Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60: 539-574.
- Grodberg J. et Dunn J.J. 1988. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170: 1245-1253.

- Guerra-Santos L.H., Käppeli O. et Fiechter A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 301-305.
- Guerra-Santos L.H., Käppeli O. et Fiechter A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *App. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 443-448.
- Gunther N.W., Nunez A., Fett W.F. et Solaiman D. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2288-2293.
- Haba E., Espuny M.J., Busquets M. et Manresa A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 379-387.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95-108.
- Häussler S., Nimtz M., Domke T., Wray V. et Steinmetz I. 1998. Purification. and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **66**: 1588-1593.
- Hobden J.A. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. *DNA Cell Biol.* **21**: 391-396.
- Hoffmann N., Amara A.A., Beermann B.B., Qi Q., Hinz H. et Rehm B.H.A. 2002. Biochemical characterisation of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid *de Novo* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 42926-42936.
- Hoffmann N., Steinbuchel A. et Rehm B.H.A. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa phaG* product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiology Letters.* **184**: 253-259.

- Hori K., Marsudi S. et Unno H. 2002. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 699-707.
- Irina V.R. et Rowe J.J 1997. Enhancement of transformation in *Pseudomonas* PAO1 by Mg²⁺ and heat. *BioTechniques.* **22**: 54-56.
- Itoh S. et Suzuki T. 1972 Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in *n*-paraffin-utilizing ability. *Agric Biol Chem* **36**: 2233-2235.
- Janssen D.B., op den Camp H.J.M., Leenen P.J.M. et van der Drift C. 1980. The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **124**: 197-203.
- Jarvis F.G. et Johnson M.J. 1949. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **71**: 4124-4126.
- Jensen P.O., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T.B., Calum H. et Christoffersen L. 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**: 1329-1338.
- Johnson M.K. et Boese-Marrazzo D. 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **29**: 1028-1033.
- Juhas M., Eberl L. et Tumbler B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **7**: 459-471.
- 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. *J. Bacteriol.* **182**: 5990-5996.
- Kownatzki R., Tumbler B. et Doring G. 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet.* **1**: 1026-1027.
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Pickford R., Derrick J.P., Lamers G. E.M., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. et Bloemberg G.V. 2004. Characterization of two *Pseudomonas*

- putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**: 97-113.
- Lang S. et Wagner F. 1993. Biological activities of biosurfactants. In *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*. Kosaric, N, (ed.). New York, USA: Marcel Dekker, pp. 251-268.
- Lang S. et Wullbrandt D. 1999. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 22-32.
- Langenbach S., Rehm B.H. et Steinbüchel A. 1997. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Letters.* **150** : 303-309.
- 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*. *Mol. Microbiol.* **21**: 1137-1146.
- Le Borgne S., Palmeros B., Valle F., Bolivar F. et Gosset G. 1998. pBRINT-Ts: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene* **223**: 213-219.
- Lee M., Kim M.K., Vancanneyt M., Swings J., Kim S.H., Kang M.S. et Lee S.T. 2005. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1409-1413.
- Lépine F., Deziel 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. *J. Mass Spectrom.* **37**: 41-46.
- Lequette Y. et Greenberg E.P. 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **187**: 37-44.
- Letoffe S., Redeker V. et Wandersman C. 1998. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares

function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* **28**: 1223-1234.

Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 999-1007.

Liu P.V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **130**: 94-99.

Lyczak, J.B., Cannon C.L. et Pier G.B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 194-222.

Lynch J.P. 3rd. 2001. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest.* **119**: 373S-384S.

Mahajan-Miklos S., Rahme L.G. et Ausubel F.M. 2000. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* **37**: 981-988.

Maier R.M. et Soberón-Chávez G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 625-633.

Mata-Sandoval J.C., Karns J. et Torrents A. 2001. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol. Res.* **155**: 249-256.

Matsufuji M., Nakata K. et Yoshimoto A. 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1213-1215.

McCarter J.D., Stephens D., Shoemaker K., Rosenberg S., Kirsh J.F. et Georgiou G. 2004. Substrate specificity of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.* **186**: 5919-5925.

McClure C.D. et Schiller N.L. 1992. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **51**: 97-102.

McClure C.D. et Schiller N.L. 1996. Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipides *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* **33**: 109-117.

- Medina G., Juárez K., Díaz R. et Soberón-Chávez G. 2003b. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulator protein. *Microbiology*. **149**: 3073-3081.
- Medina G., Juárez K., Valderrama B. et Soberón-Chávez G. 2003a. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.* **185**: 5976-5983.
- Michon F., Pozsgay V., Brisson J.-R. et Jennings H.J. 1989. Substrate specificity of naringinase, an α -L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens*. *Carbohydrate Research*. **194**: 321-324
- Mireles J.R. II, Toguchi A. et Harshey R.M. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**: 5848-5854.
- Molin S. et Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 255-261.
- Mulligan C.N. et Gibbs B.F. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3016-3019.
- Mulligan C.N., Mahmoudides G. et Gibbs B.F. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **12**: 199-204.
- Nicas T.I. et Iglewski B.H. 1985. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 387-392.
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. et von Heijne G. 1997. Neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Sys.* **8**: 581-599.
- Nitschke M., Costa S.G. et Contiero J. 2005. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1593-1600.

- Ochsner U.A., Fiechter A. et Reiser J. 1994. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 19787-19795.
- Ochsner U.A., Hembach T. et Fiechter A. 1995. Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**: 89-118.
- Ochsner U.A., Koch A.K., Fiechter A. et Reiser J. 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**: 2044-2054.
- O'Toole G., Kaplan H.B. et Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
- Pamp S.J. et Tolker-Nielsen T. 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 2531-2539.
- Park S.J. et Lee S.Y. 2002. Identification and characterization of a new enoyl Coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 5391-5397.
- Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H. et Greenberg E.P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 197-201.
- Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H. et Greenberg E.P. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 1490-1494.
- Pearson J.P., Pesci E.C. et Iglewski B.H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**: 5756-5767.

- Pearson J.P., Van Delden C. et Iglewski B.H. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**: 1203-1210.
- Pedersen M., Permin H., Kristensen K.S. et Norn S. 1992. Microbial antigens and cytokines cause type I allergic reactions in AIDS patients. In vitro studies of basophil histamine release. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **60**: 74-79.
- Pesci E.C., Milbank J.B., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P. et Iglewski B.H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 11229-11234.
- Pesci E.C., Pearson J.P., Seed P.C. et Iglewski B.H. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 3127-3132.
- Pham T, Jeremy S., Webb J.S. et Rehm B.H.A. 2004. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* **150**: 3405-3413.
- Pier G.B. 2002. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 81-86.
- Prescott L., Harley J.P. et Klein D.A. 1995. *Microbiologie*: Bruxelles, W.C. Brown Publishers, 1013 p.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M. et Séraphin B. 2001. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods.* **24**: 218-29.
- Rahim R., Ochsner U. A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam J.S. et Soberon-Chàvez G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **40**: 708-718.
- Rahme, L.G., Ausubel F.M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B.C., Lau G.W., Mahajan-Miklos S., Plotnikova J., Tan M.W., Tsongalis J., Walendziewicz C.L. et Tompkins R.G. 2000.

Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8815-8821.

Rajan S. et Saiman L. 2002. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* **17**: 47-56.

Rashid M.H. et Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4885-4890.

Rashid M.H., Rumbaugh K., Passador L., Davies D.G., Hamood A.N., Iglewski B.H. et Kornberg A. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 9636-9641.

Read R.C., Roberts P., Munro N., Rutman A., Hastie A., Shryock T., Hall R., McDonald-Gibson W., Lund V. et Taylor G. 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* **72**: 2271-2277.

Rehm B.H.A., Kruger N. et Steinbuchel A. 1998. A new metabolic link between fatty acid *de Novo* synthesis and polyhydroalkanoate acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 24044-24051.

Rehm B.H.A., Mitsky T.A. et Steinbuchel A. 2001. Role of fatty acid *de Novo* biosynthesis in polyhydroxyalcanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonads*: establishment of transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 3102-3109.

Ren Q.N., Witholt S.B. et Kessler B. 2000. FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 2978-2981.

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. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.

- Rowen D.W. et Deretic V. 2000. Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **36**: 314-327.
- Rumbaugh K.P., Griswold J.A. et Hamood A.N. 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**: 1721-1731.
- Sabirova J.S., Ferrer M., Regenhardt D., Timmis K.N. et Golyshin P.N. 2006. Mutation in a "tesB-Like" hydroxyacyl-Coenzyme A specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *J. Bacteriol.* **188**: 8452-8459.
- Sailer F.C., Meberg B.M. et Young K.D. 2003. β -Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 245-249.
- Salyers A.A. et Whitt D.D. 2002. Bacterial pathogenesis : a molecular approach, 2ième édition. Washington, D.C., ASM Press, chapitre 16 p. 247-262
- Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Santos A.S., Pereira N.Jr. et Freire D.M.G. 2002. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz. J. Chem. Eng.* **19**: 159-166.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. et Davies D.G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154.
- Schooling S.R., Charaf U.K., Allison, D.G. et Gilbert P. 2004. A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* **1**: 91-99.
- Schweizer H. 1991. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene.* **97**:109-112.
- Shapiro J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 81-104.

- Sharma A., Jansen R., Nimtz M., Johri B.N. et Wray V. 2007. Rhamnolipids from the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. GRP(3) that reduces damping-off disease in Chilli and tomato nurseries. *J. Nat. Prod.* **70**: 941-947.
- Shine J. et Dalgarno L. 1974. The 39-terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 1342-1346.
- Sim L., Ward O.P. et Li Z.-Y. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 232-238.
- Simoni S.F., Bosma T.N.P., Harms H. et Zehnder A.J.B. 2000. Bivalent cations increase both the subpopulation of adhering bacteria and their adhesion efficiency in sand columns. *Env. Science Technol.* **34**: 1011-1017.
- Smith R.S. et Iglewski B.H. 2003. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin. Microbiol.* **6**: 56-60.
- Somerville G., Mikoryak C.A. et Reitzer L. 1999. Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during Exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity. *J. Bacteriol.* **81**: 1072-1078.
- Stevens A.M. et Greenberg E.P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* **179**: 557-562.
- Stevens, A.M., Dolan K.M. et Greenberg E.P. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12619-12623.
- Sullivan E. 1998. Molecular genetics of biosurfactan production. *Curr. Opin. Biotechnol* **9**: 263-269.
- Syldatk C., Lang S., Matulovic U. et Wagner F. 1985. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z Naturforsch.* **40** : 61-67.

- Timm A. et Steinbüchel A. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem* . 209: 15-30.
- Toutain CM, Caiazza NC, O'Toole GA. 2004. Molecular basis of biofilm development by pseudomonads. Dans: Ghannoum M. et O'Toole GA, editors. *Microbial biofilms*. Washington DC: ASM Press. 43-63.
- Stover C.K., Pham X.Q. , Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J. , Brinkman F.S.L., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-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: 959-964.
- Tremblay J., Richardson A.-P., Lépine F. et Déziel E. 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Env. Microbiol.* 9: 2622-2630.
- Trummler K., Effenberger F. et Sylødatk C. 2003. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 563-571.
- Tuleva B.K., George R., Ivanov G.R. et Christova N.E. 2002. Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. *Z. Naturforsch.* 57c: 356-360.
- van Delden C. 2004. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, dans. Ramos J-L., ed., *Pseudomonas 2*: New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, p. 553.
- van Delden C. et Iglewski B.H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 551-560.
- Venkata Ramana K. et Karanth N.G. 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J.Chem.Tech. Biotechnol.* 45: 249-257.

- Vilain S., Cosette P., Zimmerlin I., Dupont J.-P., Junter G.-A. et Jouenne T. 2004. The biofilm proteome: homogeneity or versatility? *J. Proteome Res.* **3**:132-6.
- Vuong, C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R. et Otto M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence. *J. Biol. Chem.* **279**: 54881-54886.
- Wang Q, Fang X., Bai B., Liang X., Shuler P.J., Goddard W.A. III et Tang Y. 2007. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol. Bioengin.* **98**:842-853.
- Weiner M.P., Anderson C., Jerpseth B., Wells S., Johnson-Browne B. et Vaillancourt P. 1994. Studier pET system vectors and hosts. *Strategies* **7**: 41-43
- West S.E.H., Schweizer H.P., Dall C., Sample A.K. et Runyen-Janecky L.J. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **148**: 81-86.
- Winslow C-E.A., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede J.C., Rogers L.A. et Smith G.H. 1917. The families and genera of the bacteria. *J. Bacteriol.* **2**: 505-566.
- Winson, M.K., Camara M., Latifi A., Foglino M., Chhabra S.R., Daykin M., Bally M., Chapon V., Salmond G.P. et Bycroft B.W. 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 9427-9431.
- Yuan X., Ren F., Zeng G., Zhong H., Fu H., Liu J. et Xu X. 2007. Adsorption of surfactants on a *Pseudomonas aeruginosa* strain and the effect on cell surface lyphophilic property. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:1189-1198.
- Zhang Y. et Miller R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 2101-2106.

- Zhong H., Zeng G.M., Yuan X.Z., Fu H.Y., Huang G.H. et Ren F.Y. 2007. Adsorption of rhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:447-455.
- Zhu K. et Rock C.O. 2008. RhlA converts β -hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**: 3147-3154.
- Zverlov V.V., Hertel C., Bronnenmeier K., Hroch A., Kellermann J., Schwarz W.H. 2000. The thermostable alpha-L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial alpha-L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Mol Microbiol.* **35**: 173-179.

Annexes

Publications

- Tremblay J., Richardson A.-P., Lépine F., Déziel E. 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environnemental Microbiology*. 9:2622-2630.

Contribution: Analyse et production des données en spectrométrie de masse.

- Cabrera-Valladares N., Richardson A.-P., Olvera C., Treviño L.G., Déziel E., Lépine F., Soberón-Chávez G. 2006. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host.. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73:187-94.

Communications par affiche

- Tremblay J., Richardson A.-P., Lépine F., Déziel E. (Mars 2007). Evidence for self-produced metabolites regulating swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. Congrès de la "American society for microbiology - 4th ASM Conference on Biofilms"

Contribution: Analyse et production des données en spectrométrie de masse.

- Richardson A.-P., Déziel E., Lépine F. (Juin 2007). Cloning, expression, purification and functional characterization of RhIA from *Pseudomonas aeruginosa* - 57^{ième} Congrès annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, Québec, Canada
- Richardson A.-P., Lépine F. (Novembre 2005) Cloning, expression, purification and functional characterization of RhIA from *Pseudomonas aeruginosa*. 4^{ième} Congrès Armand-Frappier, Lac à L'Eau Claire, St-Alexis-Des-Monts, Canada
- Gauthier E., Lépine F., Milot S., Richardson A.-P., Déziel E., Rahme L.G. (Juin 2004) LC/MS/MS Quantification of N-Butanoyl- and N-3-Oxododecanoylhomoserine lactone in *P. aeruginosa* cultures - 52^{ième} Congrès de l'American Society for Mass Spectrometry, Nashville, USA

Contribution: Échantillonnage, analyse et production des données LC/MS/MS.

- Richardson A.-P., Shaw L.J., Burns R.G. (Novembre 2003) Biodégradation de l'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-tiazine) dans la rhizosphère d'une plante résistante à l'atrazine - 3^{ième} Congrès INRS-Institut Armand-Frappier, Lac Delage, Québec, Canada

