

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

# **La régulation et l'optimisation de la production des rhamnolipides chez *Burkholderia glumae***

Par  
Arvin Nickzad

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

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
Examineur interne

**Dr. Claude Guertin**  
INRS – Institut Armand-Frappier

Examineur externe

**Dr. Sébastien Faucher**  
Département des sciences des ressources  
naturelles - Université McGill

Examineur externe

**Dr. Gabriel G. Perron**  
Bard College

Co-directeur de thèse

**Dr. François Lépine**  
INRS – Institut Armand-Frappier

Directeur de thèse

**Dr. Éric Déziel**  
INRS – Institut Armand-Frappier



# REMERCIEMENTS

Mes plus vifs remerciements vont aux personnes qui ont contribué au bon déroulement et à l'aboutissement de cette thèse.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Eric Déziel, mon directeur de recherche, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui m'a donné la chance d'apprendre et de réaliser cette thèse et m'a fait confiance du début à la fin. Je retiens ses conseils avisés et la disponibilité constante dont il a toujours fait preuve.

Ma gratitude va également au Pr. François Lépine, mon co-directeur de recherche, pour m'avoir appris à maîtriser les analyses CL/SM. Je suis également extrêmement reconnaissant envers le Pr. Claude Guertin, pour le temps qu'il m'a consacré pour les discussions scientifiques très bénéfiques et ses précieux conseils.

Je suis également extrêmement reconnaissant envers Marie-Christine Groleau qui m'a été d'une aide constante et précieuse. Mes remerciements s'adressent également à Sylvain Milot qui m'a offert de l'aide à chaque fois que j'en avais besoin.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres et stagiaires du laboratoire : Ahmad, Fabrice, Adeline, Carlos, Servane, Audrey-Anne, Annelise, Snizhana, Elyna, Anissa, Sophie, Justine, Soumaya, Ghizlane, Sarah, Fadi et Koyomi avec lesquels j'ai passé ces années très agréables. Pour votre aide et votre amitié, je suis extrêmement reconnaissant.

Mes remerciements vont également à mes amis pour le soutien et les encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer, tout au long de cette entreprise.

J'aimerais aussi remercier la Fondation Armand-Frappier, à la compagnie Lallemand, pour le soutien financier qu'ils m'ont octroyé à la fin de ma dernière année d'études.

Enfin, mes chers parents, Arefeh et Reza pour leur soutien inestimable et ainsi que mes frères Arash et Aryan pour vos encouragements sans faille. Pour ceci, je vous remercie éternellement.

## RESUME

Les rhamnolipides sont des glycolipides d'origine microbienne qui possèdent des propriétés tensioactives et qui sont principalement produits par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. En raison de leurs propriétés spécifiques, de leur faible toxicité et de leur biodégradabilité élevée, ils sont considérés comme étant les biosurfactants qui présentent le potentiel le plus élevé pour devenir la prochaine génération de surfactants biologiques à être introduite sur le marché. Néanmoins, la faisabilité économique de la production à l'échelle commerciale de ces glycolipides est limitée, notamment l'insuffisance de la productivité, les coûts élevés de matières premières et de récupération post-production. Par ailleurs, la principale bactérie productrice des rhamnolipides, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste chez les humains, responsable de nombreuses infections nosocomiales, ce qui non seulement peut conduire à des coûts de production plus élevés, mais peut aussi provoquer une certaine réticence des consommateurs vis-à-vis de produits contenant des rhamnolipides. Donc, pour surmonter tous ces problèmes, l'utilisation d'espèces non-pathogènes s'avère être une stratégie prometteuse.

Ainsi, dans cette thèse, la production des rhamnolipides et leur fonctionnement chez *Burkholderia glumae*, un phytopathogène inoffensif pour l'Homme, que des travaux antérieurs avaient révélé possédant une excellente capacité à produire des rhamnolipides, ont été étudiées. De ce fait, des objectifs de recherches s'inscrivaient dans une approche classique visant à améliorer la production des rhamnolipides en procédant à l'optimisation des composants des milieux nutritifs comme, par exemple, les sources de carbone et d'azote. Cependant, puisque leur production est génétiquement contrôlée par des systèmes de régulation très complexes, il était essentiel d'élucider, initialement, les mécanismes de régulation de la biosynthèse de ces biosurfactants chez cette espèce bactérienne.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord étudié la régulation des rhamnolipides chez *B. glumae*. Nous avons montré que le « *quorum sensing* » (QS) régule la biosynthèse des rhamnolipides chez *B. glumae*. De plus, nous avons aussi démontré que les rhamnolipides sont essentiels à la motilité de type « *swarming* » et de ce fait, le QS contrôle le « *swarming* » par la régulation de la production des rhamnolipides.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que la régulation des rhamnolipides par le QS n'est pas absolue et qu'elle est corrélée avec le taux de croissance. Nous avons trouvé que la diminution de la concentration d'éléments nutritifs mène à une induction de l'expression des gènes requis pour la production de rhamnolipides suggérant une corrélation inverse avec le taux de croissance de la bactérie. Nos résultats démontrent que dans des conditions de taux de croissance ralenties, le QS est le principal mécanisme responsable de la régulation de rhamnolipides. Cette découverte soulève la question de la signification adaptative du QS dans la régulation de facteurs extracellulaires dont bénéficient tous les membres d'un groupe (« bien public »). Nos résultats impliquent que la régulation des rhamnolipides par le QS chez *B. glumae* est associée aux conditions de croissance ralentie et la signification adaptative du QS est vraisemblablement de promouvoir la motilité de type « *swarming* » dans des conditions nutritives limitées comme un mécanisme de dispersion qui permet de trouver de nouvelles niches.

Finalement, dans le cadre d'optimisation du milieu de culture pour l'amélioration de la production des rhamnolipides chez *B. glumae*, le criblage des sources d'azote et de carbone pour l'utilisation dans un milieu minéral a été effectué. L'urée et le mannitol ont été choisis comme étant les meilleures sources d'azote et de carbone respectivement. De plus, des résultats obtenus à partir d'expériences concernant un plan d'expérience factoriel fractionnaire afin de sélectionner



parmi un grand nombre de variables, les principaux facteurs requis pour augmenter et optimiser la production des rhamnolipides chez *B. glumae* ont été présentés. Ainsi, le potassium, le mannitol, le calcium et l'urée ont été démontrés comme ayant un effet significatif sur la production des rhamnolipides par *B. glumae*. Nous avons démontré qu'en appliquant la méthodologie des surfaces de réponse (MSR), une production de rhamnolipides de 1,66 g/L a été obtenue ce qui est cinq fois plus élevé que celui des conditions initiales avant MSR.

En conclusion, les résultats rapportés dans cette thèse améliorent les connaissances sur la régulation des rhamnolipides chez *B. glumae*. À plus long terme, cet ouvrage contribuera à l'identification de l'étape limitante dans la biosynthèse des rhamnolipides et la régulation des gènes des rhamnolipides par le QS chez *B. glumae*.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>SYNTHESE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>2</b>
1.1.1	Biosurfactants .....	2
1.1.2	Rhamnolipides .....	4
1.1.3	Rôle des rhamnolipides dans la vie bactérienne .....	5
1.1.4	Biosynthèse et la régulation génétique des rhamnolipides .....	5
1.1.5	Applications des rhamnolipides .....	9
1.1.6	Stratégies pour l'amélioration de la production des rhamnolipides .....	10
1.1.6.1	Utilisation des substrats moins chers et des résidus industriels.....	10
1.1.6.2	Développement de bioprocédé .....	11
1.1.6.3	Amélioration et développement de souches surproductrices .....	14
1.1.7	Producteurs de rhamnolipides autres que <i>P. aeruginosa</i> .....	14
1.1.8	Biosynthèse des rhamnolipides chez <i>Burkholderia</i> spp. ....	16
1.1.9	<i>Burkholderia glumae</i> .....	18
1.1.10	Facteurs de virulence de <i>B. glumae</i> .....	19
1.1.11	QS chez <i>B. glumae</i> .....	19
1.1.12	Hypothèses de travail et objectifs .....	22
<b>2</b>	<b>PUBLICATIONS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Quorum sensing controls swarming motility of <i>Burkholderia glumae</i> through regulation of rhamnolipids</b> .....	<b>25</b>
2.1.1	Abstract .....	26
2.1.2	Introduction .....	26
2.1.3	Materials and methods .....	28
2.1.3.1	Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions .....	28
2.1.3.2	Mutant and reporter construction .....	29
2.1.3.3	LC/MS rhamnolipid analysis .....	30
2.1.3.4	Measurement of <i>rhIA'-lux</i> expression .....	31
2.1.4	Results.....	31
2.1.4.1	Rhamnolipid production is necessary for <i>B. glumae</i> swarming motility.....	31

2.1.4.2	Quorum sensing modulates swarming motility of <i>B. glumae</i> through regulation of rhamnolipid production .....	34
2.1.5	Discussion .....	37
2.1.6	Acknowledgments .....	39
2.1.7	Résultats supplémentaires à l'article : « Quorum sensing controls swarming motility of <i>Burkholderia glumae</i> through regulation of rhamnolipids » .....	40
2.1.7.1	Optimisation des conditions pour la préparation de géloses « <i>swarming</i> » pour <i>B. glumae</i> .....	40
2.1.7.2	Étude du rôle des rhamnolipides dans la pathogénicité de <i>B. glumae</i> .....	41
<b>2.2</b>	<b>Adaptive Significance of Quorum Sensing-Dependent Regulation of Rhamnolipids by Integration of Growth Rate in <i>Burkholderia glumae</i>: A Trade-Off between Survival and Efficiency .....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Abstract .....	45
2.2.2	Importance.....	46
2.2.3	Introduction.....	46
2.2.4	Materials and methods .....	49
2.2.4.1	Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions .....	49
2.2.4.2	Growth rate measurement.....	50
2.2.4.3	Reporter construction .....	50
2.2.4.4	LC/MS rhamnolipid analysis .....	50
2.2.4.5	LC/MS-MS analysis for AHL production.....	51
2.2.4.6	Measurement of <i>rhIA'-lux</i> activity .....	51
2.2.5	Results.....	51
2.2.5.1	Quorum sensing regulation of rhamnolipid production in <i>B. glumae</i> is nutritionally conditional.....	51
2.2.5.2	Quorum sensing-dependent regulation of rhamnolipids is coupled to growth rate.....	52
2.2.5.3	Nutritional cues amplify rhamnolipid biosynthesis gene expression through QS-dependent regulation .....	54
2.2.6	Discussion .....	55
2.2.7	Acknowledgments .....	58
<b>2.3</b>	<b>Optimization of culture conditions for rhamnolipids production by <i>Burkholderia glumae</i> .....</b>	<b>59</b>
2.3.1	Abstract .....	60

2.3.2	Introduction.....	61
2.3.3	Materials and methods .....	63
2.3.3.1	Microorganism and inoculum preparation .....	63
2.3.3.2	Rhamnolipids and mannitol quantification .....	64
2.3.3.3	Biomass measurement.....	64
2.3.3.4	Selection of optimal carbon and nitrogen sources .....	64
2.3.3.5	FFD .....	65
2.3.3.6	RSM .....	66
2.3.3.7	Design matrix and data analysis .....	66
2.3.3.8	Optimization and model verification .....	67
2.3.4	Results and discussion.....	67
2.3.4.1	Selection of optimal carbon and nitrogen sources .....	67
2.3.4.2	Selection of significant parameters by FFD.....	69
2.3.4.3	CCD and fitted regression models for rhamnolipids production by <i>B. glumae</i> .....	74
2.3.4.4	Optimization and model verification .....	83
2.3.5	Conclusion.....	84
2.3.6	Acknowledgments .....	84
<b>3</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>Annexe A: mini-revue: The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control? .....</b>	<b>106</b>
5.1.1	Abstract .....	107
5.1.2	Introduction.....	107
5.1.3	Biosurfactants and their role in biofilms.....	108
5.1.4	Rhamnolipids are actively involved in different stages of biofilm development .....	109
5.1.4.1	Adherence and microcolony formation.....	110
5.1.4.2	Proliferation and formation of the differentiated biofilm .....	111
5.1.4.3	Detachment and dispersion of planktonic cells .....	111
5.1.5	From evidence to action .....	112

5.1.6 Conclusion.....	114
5.1.7 Acknowledgments .....	115
5.1.8 References .....	115
<b>5.2 Annexe B: L'identification des régulateurs directs et indirects de l'opéron <i>rhIA</i>..</b>	<b>119</b>
5.2.1 Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production des rhamnolipides .....	119
5.2.1.1 Mutagenèse aléatoire de <i>B. glumae</i> par conjugaison .....	119
5.2.1.2 Méthodologie de criblage .....	120
5.2.1.3 Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production des rhamnolipides.....	120
5.2.1.4 Test de défauts de croissance .....	121
5.2.1.5 Analyse de production des rhamnolipides par CL/SM .....	122
5.2.1.6 L'identification du site d'insertion du transposon dans le chromosome par amplification PCR double .....	122

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma de mécanismes d'action des molécules tensioactives à l'interface gaz-liquide et liquide-liquide.....	2
Figure 1.2 Les structures chimiques des rhamnolipides.....	4
Figure 1.3 Le modèle actuel de biosynthèse des rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> . ....	6
Figure 1.4 Le paradigme du QS chez bactéries a Gram négative établi à partir de <i>V. fischeri</i> . ...	7
Figure 1.5 Représentation schématique de l'agencement génétique des opérons <i>rhl</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. thailandensis</i> E264, <i>B. pseudomallei</i> 1710b et <i>B. glumae</i> BGR1. ....	17
Figure 1.6 Schéma de système de QS <i>tof</i> chez <i>B. glumae</i> BGR1. ....	20
Figure 2.1 Rhamnolipids production of various <i>B. glumae</i> strains.....	32
Figure 2.2 Swarming motilities of various <i>B. glumae</i> strains. ....	33
Figure 2.3 Expression from the <i>rhl</i> operon promoter in wild-type and <i>tofI</i> - strains carrying a chromosomal <i>rhIA'-lux</i> transcriptional reporter. ....	35
Figure 2.4 Swarming motility of <i>tofI</i> mutant at 28°C and 37°C.....	36
Figure 2.5 Swimming motility of <i>B. glumae</i> strains. ....	37
Figure 2.6 Phénotype « <i>swarming</i> » de <i>B. glumae</i> obtenu avec les milieux M9DCAA et LB. ....	40
Figure 2.7 Influence de temps de séchage sous hotte à flux laminaire et la température d'incubation sur le « <i>swarming</i> » de <i>B. glumae</i> . ....	41
Figure 2.8 L'essai de pathogénicité de différentes souches de <i>B. glumae</i> envers l'oignon.....	42
Figure 2.9 L'air de surface de la zone de macération sur les pelures d'oignons causé par les différentes souches de <i>B. glumae</i> .....	43
Figure 2.10 Rhamnolipid production of <i>B. glumae</i> strains in minimal vs complex media. ....	52
Figure 2.11 Contribution of quorum sensing in production of rhamnolipids by <i>B. glumae</i> in different dilutions of complex NB culture medium.....	53
Figure 2.12 Effect of growth rate on specific yield of rhamnolipids and C8-HSL concentration..	54
Figure 2.13 The effect of growth rate on expression from the <i>rhl</i> operon promoter in wild-type and <i>tofI</i> strains carrying a chromosomal <i>rhIA'-lux</i> transcriptional reporter .....	55

Figure 2.14 Growth and rhamnolipids production of <i>B. glumae</i> BGR1 during screening on different carbon and nitrogen sources. Production: (a) carbon (b) nitrogen, growth: (c) carbon, (d) nitrogen.....	68
Figure 2.15 Half-Normal probability plot of main and two-factor interaction effects on (a) rhamnolipid production and (b) biomass dry weight obtained from FFD. ....	72
Figure 2.16 Influence of potassium on rhamnolipids production of <i>B. glumae</i> .....	79
Figure 2.17 The response surface plot of rhamnolipids production as a function of potassium phosphate buffer and calcium chloride. ....	80
Figure 2.18 The response surface plot of biomass production as a function of potassium phosphate buffer and mannitol. ....	81
Figure 2.19 The response surface plot of substrate-to-product conversion yield as a function of mannitol and potassium phosphate buffer. ....	82
Figure 5.1 Representation of rhamnolipids implication in different stages of <i>P. aeruginosa</i> biofilm development. ....	112
Figure 5.2 Comparaison des gouttelettes d'huile formées autour des colonies de souche sauvage et le mutant <i>rhlA</i> . ....	120
Figure 5.3 Criblage des transposants affectés dans la production des rhamnolipides. ....	121
Figure 5.4 La production des rhamnolipides par les transposant sélectionnés. ....	122
Figure 5.5 Exemple de produits PCR obtenus par la réaction PCR arbitraires en deux rondes. ....	123

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Organisation génomique du <i>B. glumae</i> BGR1 .....	18
Table 2.1 Bacterial strains and plasmids. ....	28
Table 2.2 PCR Primers. ....	30
Table 2.3 Bacterial strains and plasmids .....	49
Table 2.4 Maximum and minimum values of the variables used for the production of rhamnolipids by <i>B. glumae</i> BGR1 using FFD. ....	65
Table 2.5 Experimental range and levels of the independent variables used in CCD .....	66
Table 2.6 Experimental design and results of the FFD .....	70
Table 2.7 ANOVA analysis for the reduced regression model of rhamnolipid production .....	74
Table 2.8 ANOVA analysis for the reduced regression model of biomass production.....	74
Table 2.9 ANOVA for the regression model of rhamnolipids production obtained from CCD results .....	76
Table 2.10 ANOVA for the regression model of biomass production obtained from CCD results .....	76
Table 2.11 ANOVA for the regression model of $Y_{P/S}$ obtained from CCD results .....	77
Table 2.12 Solution for simultaneous maximization of rhamnolipids production and $Y_{P/S}$ .....	83
Table 2.13 Obtained experimental values of responses upon using optimum conditions as predicted by optimization of models.....	83
Tableau 5.1 Caractéristiques des transposants affectés dans la production des rhamnolipides. ....	125



## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	<i>N</i> -(3-oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone
EPA	Agence américaine de protection de l'environnement
AHL	<i>N</i> -acyl-L-homosérine lactones
ANOVA	Analysis of variance
C <sub>4</sub> -HSL	<i>N</i> -butanoyl-L-homosérine lactone
C <sub>6</sub> -HSL	<i>N</i> -hexanoyl-L-homosérine lactone
C <sub>8</sub> -HSL	<i>N</i> -octanoyl-L-homosérine lactone
CCD	Central Composite Design
CL/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CMC	Concentration micellaire critique
CV	Coefficient of variance
dTDP	Deoxythymidine diphosphate
ESI	Electrospray ionization
FFD	Fractional factorial design
FRT	FLP (Flippase) recognition target
Gm	Gentamycine
GO	Ontologie génique
HAA	Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy) alcanoïque
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinolines
HHQ-d4	5,6,7,8-tétradeutéro-4-hydroxy-2-heptylquinoline
HPLC	high-performance liquid chromatography
LB	Lysis Broth (Bouillon LB)
MSM	Mineral salts medium
MSR	Méthodologie de surface de réponse
NB	Nutrient broth (Bouillon nutritif)
OD600	Optical density at 600 nm (DO600)
PBS	Phosphate-buffered saline (saline tampon phosphate)
PRESS	Predicted residual sum of squares
QS	Quorum sensing
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanyol- $\beta$ -hydroxydécanoate
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanyol- $\beta$ -hydroxydécanoate
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxytétradécanyol- $\beta$ -hydroxytétradécanoate
RL	Rhamnolipides
RLU	Relative light units
ROS	Reactive Oxygen Species (radicaux)
RSM	Response surface methodology
T3SS	Sécrétion de type III
Tc	Tétracycline

TSB  
WT

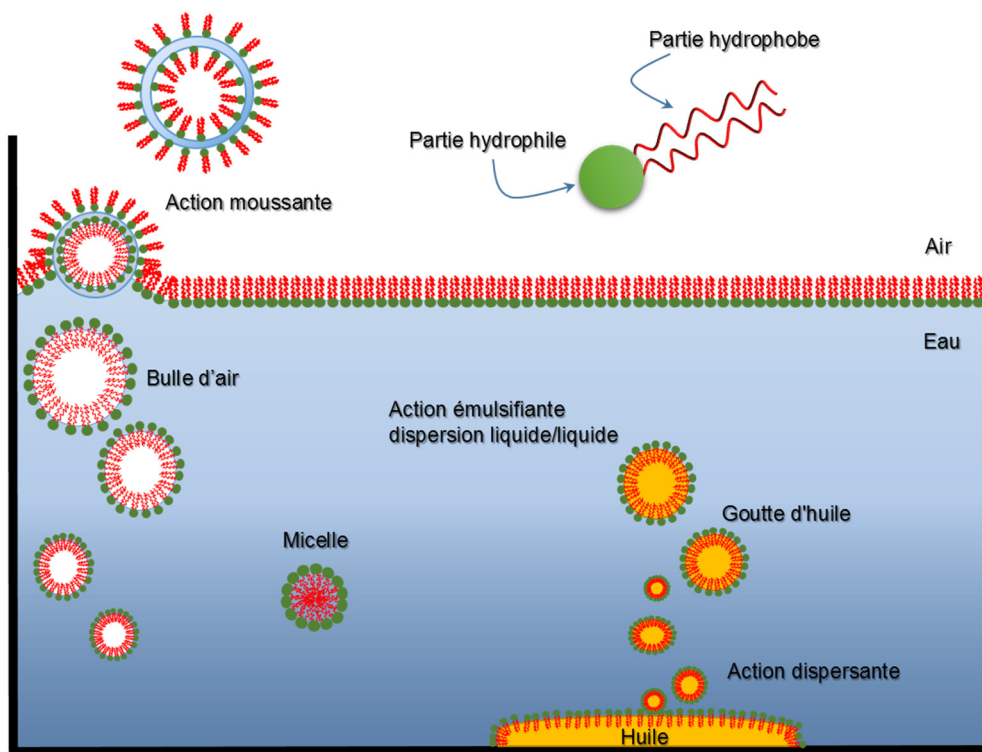
Tryptic Soy Broth (Bouillon TSB)  
Wild-type (sauvage)

# 1 SYNTHÈSE

# 1.1 Introduction

## 1.1.1 Biosurfactants

Les agents tensioactifs sont capables de réduire la tension superficielle et interfaciale entre deux phases en s'accumulant à l'interface, facilitant ainsi le mélange et la dispersion des phases et la formation d'émulsions et de mousses (Figure 1.1). Les propriétés de surface de ces molécules sont attribuées à leur nature amphiphile, ce qui signifie qu'elles possèdent à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe. Par exemple, sur une surface d'eau, les agents tensioactifs s'orientent d'une manière telle que le groupement hydrophile se trouve dans l'eau et le groupement hydrophobe en phase gazeuse (voir Figure 1.1). La partie apolaire est typiquement de nature lipidique alors que la tête polaire est variable et sa nature chimique constitue le critère de classification des tensioactifs (De Guertechin, 1999).



**Figure 1.1 Schéma de mécanismes d'action des molécules tensioactives à l'interface gaz-liquide et liquide-liquide.**

En faible concentration, l'ajout de tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air entraîne une baisse de la tension interfaciale. Une fois l'interface des phases saturée, l'augmentation de concentration des tensioactifs ne diminue plus la tension interfaciale. Par contre, ceci mène à l'auto-assemblage des molécules tensioactives en agrégats sphéroïdal à l'intérieur du volume de phase, appelés micelle. La concentration au-dessus de laquelle la tension superficielle devient constante et les micelles se forment spontanément est la concentration micellaire critique (CMC).

Les agents tensioactifs représentent une classe polyvalente de produits chimiques largement utilisés dans presque tous les secteurs de l'industrie moderne. La production mondiale totale de surfactants était de plus de 13 millions de tonnes en 2008 et selon un nouveau rapport réalisé par «Institut de recherche de marché Ceresana», le marché mondial des surfactants pourrait générer des revenus de plus de 40,1 milliards USD en 2022 (Ashby *et al.*, 2013). Cette énorme demande du marché pour des surfactants est actuellement comblée par de nombreux agents tensioactifs synthétiques, principalement par des molécules dérivées du pétrole, qui ne sont souvent que partiellement biodégradables, et toxiques pour l'environnement.

Toutefois, au cours de ces dernières années, une évolution vers l'utilisation des tensioactifs à risque réduit et respectueuse de l'environnement, causée par une prise de conscience grandissante des consommateurs et des entreprises pour les effets néfastes que les agents tensioactifs peuvent avoir sur l'environnement est observée (Ivanković *et al.*, 2010). En outre, le vigoureux mouvement actuel pour le développement industriel durable a considérablement accru l'intérêt dans les biosurfactants comme une alternative éventuelle, pour au moins certains de ces agents tensioactifs chimiques.

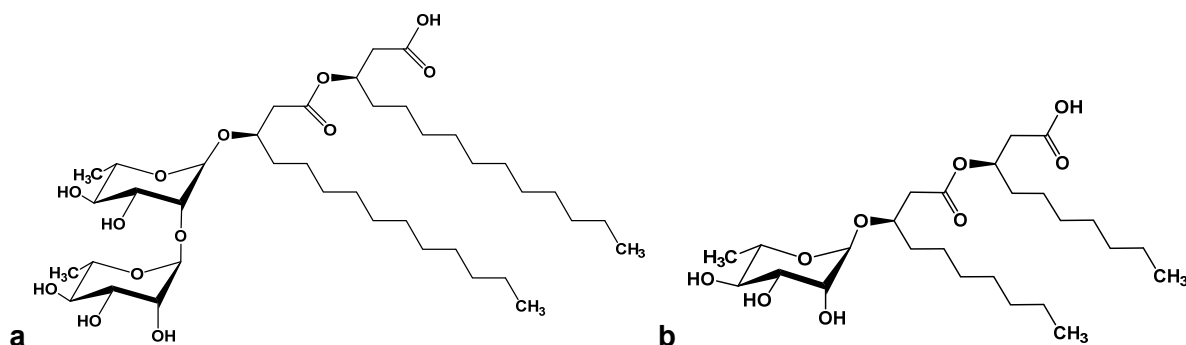
Les biosurfactants sont un groupe de molécules structurellement diversifiées et produits extracellulairement par une variété de microorganismes : des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Au cours des dernières années, l'intérêt porté à ces biomolécules a considérablement augmenté en raison des nombreux avantages qu'elles présentent par rapport aux agents tensioactifs synthétiques, tels qu'une faible toxicité (Edwards *et al.*, 2003, Poremba *et al.*, 1991), une biodégradabilité élevée (Hirata *et al.*, 2009), une meilleure compatibilité avec l'environnement et une activité spécifique sur une large gamme de températures, de pH et de salinité ainsi que la capacité d'être synthétisé à partir de matières premières renouvelables (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Henkel *et al.*, 2012).

Contrairement aux surfactants synthétiques, qui sont classés selon la nature de leur groupement polaire, les biosurfactants sont catégorisés principalement selon leur composition chimique et leur origine microbienne (Desai *et al.*, 1997). En général, la partie hydrophile de la molécule est composée d'acides aminés, de peptides cycliques, de phosphates, de mono-, di- ou polysaccharides alors que la partie hydrophobe est généralement composée de longues chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés. Ainsi, parmi les grandes classes de biosurfactants, on retrouve des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des acides gras, des lipides neutres ainsi que des composés polymériques (Desai *et al.*, 1997).

### 1.1.2 Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des agents tensioactifs glycolipidiques d'origine biologique. Ils sont constitués d'une ou de deux molécules de L-rhamnose liées par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique à des acides gras  $\beta$ -hydroxylés (Déziel *et al.*, 1999). Ils présentent une excellente biodégradabilité ainsi qu'une faible toxicité en milieu aquatique (Chrzanowski *et al.*, 2012).

Les rhamnolipides ont été initialement découverts en 1946 lorsque des glycolipides, alors nommés « acide pyolipique » ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas pyocyanea* (*P. aeruginosa*) cultivées en présence de glucose (Bergström *et al.*, 1946). Des investigations complémentaires sur ces glycolipides ont révélé que ces derniers sont composés de molécules de L-rhamnose et d'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque (Hauser *et al.*, 1954, Jarvis *et al.*, 1949). Plus de 60 ans plus tard, les rhamnolipides sont parmi les biosurfactants les plus étudiés (Chrzanowski *et al.*, 2011, Maier *et al.*, 2000, Nitschke *et al.*, 2005, Ochsner *et al.*, 1996, Soberon-Chavez *et al.*, 2005).



**Figure 1.2 Les structures chimiques des rhamnolipides.**

Les deux rhamnolipides les plus communs produits par (a) *B. glumae*: le 2-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxytétradécanoïl- $\beta$ -hydroxytétradécanoate Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>; et par (b) *P. aeruginosa*: le  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanoïl- $\beta$ -hydroxydécanoate Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011, Costa *et al.*, 2011).

Les rhamnolipides sont produits sous forme de mélanges de composition variable principalement par différentes espèces du genre *Pseudomonas*, mais aussi par des bactéries appartenant à d'autres genres (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). À ce jour, environ 60 congénères et homologues de rhamnolipides ont été identifiés et chaque espèce bactérienne produit un ensemble de rhamnolipides spécifiques (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Généralement, la plupart des espèces produisent un mélange de mono-rhamnolipides et de di-rhamnolipides (Figure 1.2). Les rhamnolipides synthétisés par *P. aeruginosa* sont très largement les plus étudiés et sont principalement composés du congénère mono-rhamnolipide, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, et du congénère di-rhamnolipide, Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (Maier *et al.*, 2000, Syldatk *et al.*, 1985). Les rhamnolipides ainsi

que leurs précurseurs, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy) alcanoliques (HAAs), présentent d'excellentes propriétés tensioactives (Déziel *et al.*, 2003). Ils abaissent la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à moins de 30 mN/m et leur valeur de CMC varie de 20 à 200 mg/L (Dubeau *et al.*, 2009). Ils réduisent également la tension interfaciale hexadécane/eau de 43 mN/m à des valeurs inférieures à 1 mN/m (Dusane *et al.*, 2010). Les rhamnolipides possèdent également une excellente activité d'émulsification d'une variété d'hydrocarbures ainsi que des huiles végétales (Abalos *et al.*, 2001).

### **1.1.3 Rôle des rhamnolipides dans la vie bactérienne**

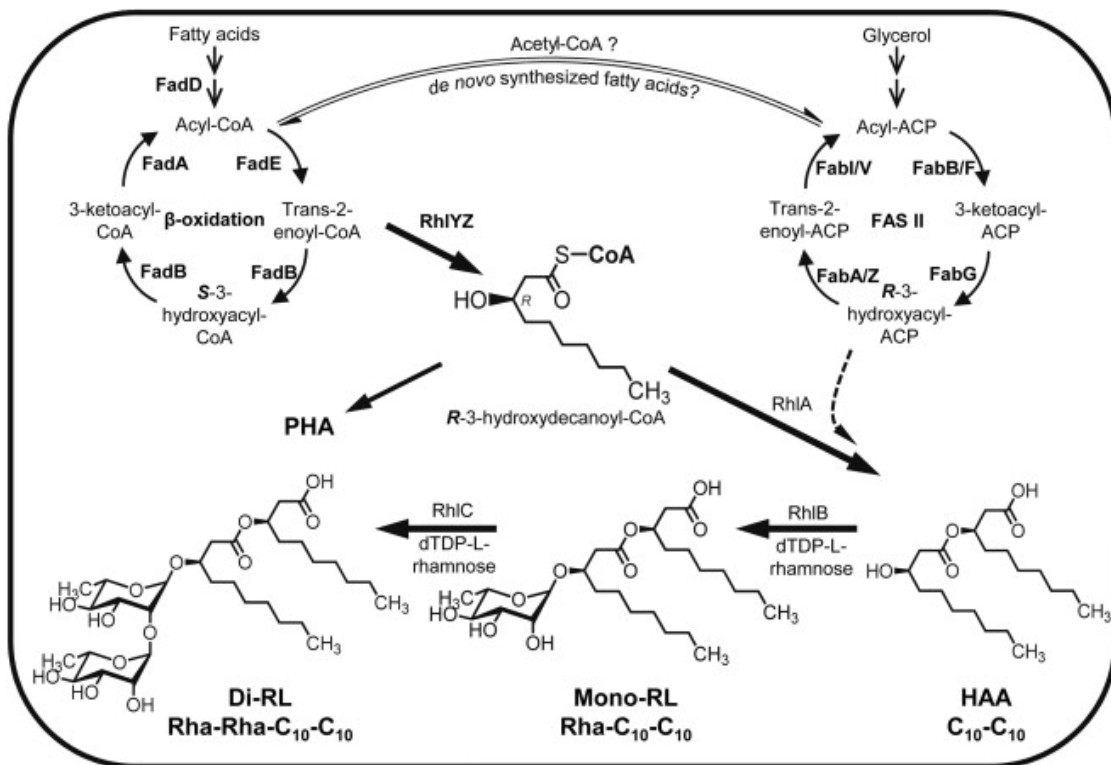
Les raisons pour lesquelles certains microorganismes produisent des rhamnolipides semblent être multiples. Les résultats de plusieurs expériences indépendantes ont contribué à une meilleure compréhension des nombreux rôles que les rhamnolipides peuvent jouer dans la vie des microorganismes (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Chrzanowski *et al.*, 2011). La fonction spécifique des biosurfactants semble être liée à des conditions environnementales particulières et à des systèmes de régulation singuliers. Parmi les nombreuses fonctions des rhamnolipides figurent la solubilisation des substrats hydrophobes (Beal *et al.*, 2000, Hisatsuk *et al.*, 1971, Itoh *et al.*, 1972, Koch *et al.*, 1991, Noordman *et al.*, 2002, Shreve *et al.*, 1995), la modification de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Al-Tahhan *et al.*, 2000, Chrzanowski *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 1994), la modulation de la motilité bactérienne (Déziel *et al.*, 2003, Tremblay *et al.*, 2007), le développement des biofilms (Davey *et al.*, 2003, Lequette *et al.*, 2005, Pamp *et al.*, 2007, Schooling *et al.*, 2004), la virulence (Kownatzki *et al.*, 1987, Read *et al.*, 1992) et l'activité antimicrobienne (Abalos *et al.*, 2001, Cosson *et al.*, 2002, Haferburg *et al.*, 1987, Itoh *et al.*, 1971, Stanghellini *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005).

### **1.1.4 Biosynthèse et la régulation génétique des rhamnolipides**

La voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* est présentée dans la Figure 1.3 (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011, Burger *et al.*, 1963, Ochsner *et al.*, 1996, Rahim *et al.*, 2001, Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, la production des rhamnolipides dépend des voies métaboliques centrales de la biosynthèse des acides gras ainsi que de la glycolyse (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b, Glaser *et al.*, 1961, Olvera *et al.*, 1999, Zhu *et al.*, 2008). Les rhamnolipides sont synthétisés par une voie bien caractérisée qui est composée de trois réactions successives

impliquant des gènes *rhl* (Zhu *et al.*, 2008). Le gène *rhlA* qui code l'enzyme RhlA catalyse la synthèse des HAA en utilisant principalement des intermédiaires de la bêta-oxydation des acides gras (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b). La deuxième réaction est catalysée par la rhamnosyltransférase 1 RhlB qui est codée par le gène *rhlB* (Ochsner *et al.*, 1994). Cette dernière est responsable du couplage d'un sucre activé, le dTDP-L-rhamnose, à un dimère d'acide gras 3-hydroxy (un HAA produit par RhlA) pour donner des mono-rhamnolipides, principalement le Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Grâce à la troisième réaction, les mono-rhamnolipides produits conjointement par RhlA et RhlB ensemble avec une molécule de dTDP-L-rhamnose, deviennent les substrats de la rhamnosyltransférase 2 RhlC qui est codée par le gène *rhlC* afin de produire des di-rhamnolipides (Rahim *et al.*, 2001).



**Figure 1.3 Le modèle actuel de biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*.**  
Figure tirée de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b)

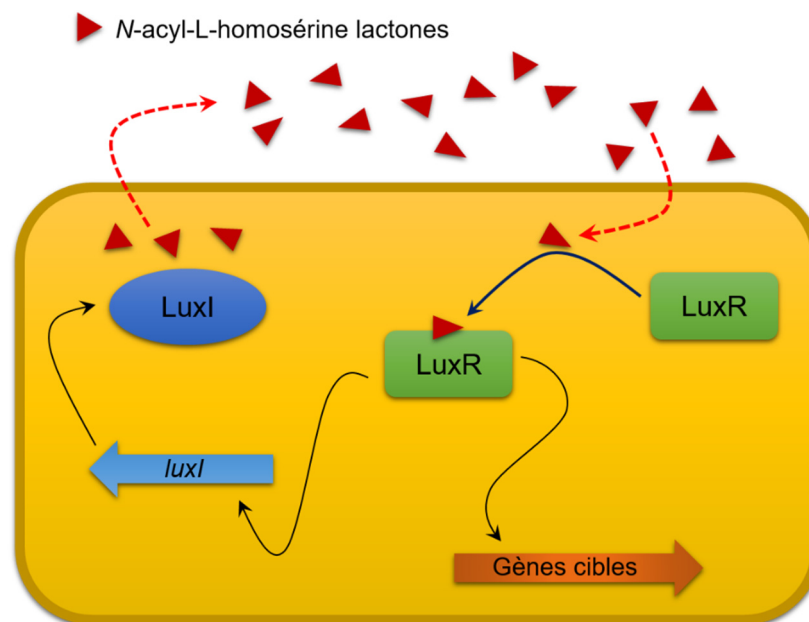
Au niveau génétique, la biosynthèse des rhamnolipides est contrôlée par un système de régulation très complexe : le « *quorum sensing* » (QS). Ce dernier est également impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 1995a, Pearson *et al.*, 1997).

En fait, de nombreuses bactéries contrôlent l'expression d'une partie de leurs génomes selon la densité de leur population, *via* des mécanismes de communication intercellulaire (Miller



*et al.*, 2001, Whitehead *et al.*, 2001). Le QS contrôle de nombreux processus cellulaires parmi lesquels figurent la virulence (Smith *et al.*, 2003), la symbiose (Loh *et al.*, 2002), la formation du biofilm (Tomlin *et al.*, 2005) et la motilité (Daniels *et al.*, 2004).

Chez les bactéries à Gram négatif, la modulation de l'expression génique *via* le QS est presque toujours organisée d'une manière similaire et implique généralement une molécule de signalisation, une synthase de type LuxI et un régulateur transcriptionnel de type LuxR (Figure 1.4). Les synthases de type LuxI sont responsables de la biosynthèse des *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) qui diffusent hors des cellules bactériennes. L'augmentation de la densité de la population bactérienne favorise ainsi la synthèse des AHL, et par conséquent, leur concentration dans l'environnement extérieur augmente. Lorsqu'une concentration-seuil critique est atteinte, ces molécules de signalisation interagissent spécifiquement avec des régulateurs transcriptionnels de type LuxR qui vont réguler l'expression de gènes-cibles en se fixant sur la région promotrice de ces derniers (Bassler, 2002).



**Figure 1.4 Le paradigme du QS chez bactéries a Gram négative établi à partir de *V. fischeri*.** Les triangles rouges indiquent les *N*-acyl-L-homosérine lactones. Figure adaptée de Waters *et al.* (2005).

Les systèmes de QS *las* et *rhl* ont été très bien caractérisés chez *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2009). Le système *las* dépend de l'AHL *N*-(3-oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL), qui est synthétisée par la synthase LasI codée par le gène *lasI* et qui contrôle l'expression de différents gènes en activant le régulateur transcriptionnel LasR codé par le gène *lasR*. Il active aussi à la fois l'expression du gène *rhlR* codant le régulateur transcriptionnel RhIR ainsi que le gène *rhlI* codant la synthase RhII. Le système *rhl* dépend du *N*-butanoyl-L-

homosérine lactone (C<sub>4</sub>-HSL) qui est produit par RhII et qui active RhIR. En activant cette dernière, l'expression des gènes codant les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse des rhamnolipides : l'opéron *rhlAB* et le gène *rhIC*, dont les produits ont été décrits ci-dessus, sont contrôlés.

Cependant, chez *P. aeruginosa*, le QS lui-même est également intégré dans un réseau étroitement interconnecté avec d'autres systèmes de régulation ayant un fort potentiel d'intégration et de réponse à des signaux environnementaux et physiologiques (Schuster *et al.*, 2006). Au niveau génétique, les régulateurs transcriptionnels, comme le régulateur de métabolites secondaires (RsmA), interfèrent avec la régulation par QS (Williams *et al.*, 2009). Le facteur sigma RpoN qui est associé au métabolisme de l'azote peut également agir sur l'expression des gènes *rhlR* et *rhlAB* (Medina *et al.*, 2003). De plus, PhoB, le régulateur du régulon Pho, induit l'expression de *rhlR* dans des conditions de limitation de phosphate par l'intermédiaire des HAQ (4-hydroxy-2-alkylquinolines) (Jensen *et al.*, 2006). Les résultats par Van Delden *et al.* (1998) ont également démontré que la limitation simultanée des sources de carbone et d'azote peut également induire la production de rhamnolipides en dépit d'une mutation dans le système *las* via la régulation du facteur sigma alternatif RpoS. En outre, au niveau post-transcriptionnel, GidA, un régulateur post-transcriptionnel, a été décrit comme étant capable de réguler la production des rhamnolipides par la modulation des niveaux de RhIR (Gupta *et al.*, 2009).

Au niveau des facteurs environnementaux, en général, trois mécanismes, à savoir, l'induction, la répression et la limitation de l'azote ou des ions multivalents, jouent un rôle dans la régulation de la production des rhamnolipides (Heyd, 2009). La biosynthèse de rhamnolipides peut être induite par l'addition de substrats hydrophobes tels que des acides gras à longue chaîne, les hydrocarbures ou les glycérides (Heyd, 2009). Pour cette raison, les concentrations les plus élevées de rhamnolipides en solution ont été rapportées avec des huiles végétales, jusqu'à près de 100 g/L (Giani *et al.*, 1996).

La biosynthèse de rhamnolipides peut également être influencée par la régulation de l'azote ou des ions métalliques. Les rhamnolipides, étant des métabolites secondaires, leur production commence au début de la phase stationnaire lorsque la source d'azote est épuisée (Müller *et al.*, 2012, Ramana *et al.*, 1989). De plus, la limitation des cations polyvalents induit également une surproduction des rhamnolipides (Chayabutra *et al.*, 2001, Guerra-Santos *et al.*, 1984). Guerra-Santos *et al.* (1986) ont démontré qu'en limitant les concentrations de sels de magnésium, de calcium, de potassium, de sodium et d'éléments traces, un rendement plus élevé de rhamnolipides peut être réalisé.

Les facteurs environnementaux et les conditions de croissance tels que le pH, la température et la disponibilité de l'oxygène affectent également la production des rhamnolipides par leurs effets sur la croissance ou l'activité cellulaire. La production maximale de rhamnolipides chez *Pseudomonas* spp. est obtenue dans un intervalle de pH de 6 à 6,5 et diminue brusquement au-dessus de pH 7 (Guerra-Santos *et al.*, 1984). Chez *Pseudomonas* sp. souche DSM 2874 la température a une influence sur la distribution des congénères de rhamnolipides produits (Syldatk *et al.*, 1985). L'oxygène dissous peut également jouer un rôle dans la production des rhamnolipides. Sabra *et al.* (2002) ont proposé que *P. aeruginosa* produit des rhamnolipides pour réduire le taux de transfert d'oxygène afin de se protéger contre le stress oxydatif, et il semble que ce mécanisme soit activé par une déficience en fer (Kim *et al.*, 2003). Cependant, la production de rhamnolipides est également obtenue en absence d'oxygène (Chayabutra *et al.*, 2001).

### **1.1.5 Applications des rhamnolipides**

D'un point de vue économique, les rhamnolipides sont présentement peu en mesure de rivaliser avec les tensioactifs synthétiques à cause de leurs coûts de production trop élevés. Toutefois, indépendamment de leurs bonnes propriétés physico-chimiques par rapport aux agents tensioactifs classiques dérivés de la pétrochimie (Abalos *et al.*, 2001, Haba *et al.*, 2003), l'intérêt envers les rhamnolipides est en augmentation grâce à leur biodégradabilité élevée et leur meilleure compatibilité avec l'environnement. En conséquence, leurs applications dans la bioremédiation (Nguyen *et al.*, 2008), la récupération assistée du pétrole (Wang *et al.*, 2007), et la biodégradation du pétrole brut (Guo-liang *et al.*, 2005) ont été investiguées depuis plusieurs années. Par ailleurs, l'utilisation potentielle des rhamnolipides dans les détergents ménagers a été étudiée (Banat *et al.*, 2010) particulièrement en raison de leur activité antimicrobienne (Vatsa *et al.*, 2010). Les rhamnolipides sont déjà employés dans la formulation d'un biofongicide (ZONIX™, société Jeneil biosurfactant, Saukville, WI, USA) en raison de leurs propriétés antimycotiques. De plus, étant donné que ces glycolipides sont les seuls biosurfactants qui aient été approuvés par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) pour une utilisation dans les produits alimentaires, cosmétiques, et pharmaceutiques (Nitschke *et al.*, 2007), il existe un grand intérêt pour l'utilisation des rhamnolipides dans les secteurs mentionnés ci-dessus.

### **1.1.6 Stratégies pour l'amélioration de la production des rhamnolipides**

Au cours des dernières années, la production des biosurfactants par divers microorganismes a été largement étudiée, et il existe maintenant amplement d'information concernant leur production, leurs types et leurs propriétés. En dépit de posséder de nombreuses propriétés commercialement attrayantes et des avantages évidents par rapport à leurs homologues synthétiques, la production des rhamnolipides à une échelle commerciale n'est pas encore largement répandue en raison de leurs coûts de production élevés. Les aspects économiques de la production de tous les métabolites microbiens tels que les rhamnolipides est régie par trois facteurs de base : les coûts des matières premières, la disponibilité des procédures appropriées de production économique et de récupération, et le rendement du produit par les microorganismes producteurs (Mukherjee *et al.*, 2006). Ainsi, compte tenu de ces contraintes économiques liées à la production de rhamnolipides, trois stratégies de base ont été adoptées par les chercheurs afin de réduire les coûts de ces processus.

#### **1.1.6.1 Utilisation des substrats moins chers et des résidus industriels**

Les matières premières peuvent constituer de 10 à 50% du coût final de production de biosurfactants (Kosaric *et al.*, 1993). Dépendamment de la pureté désirée du produit, les coûts de production sont principalement influencés soit par les coûts des matières premières, soit par le coût de purification. Les rhamnolipides peuvent être utilisés dans des produits chimiques fins, tels que des produits pharmaceutiques ou cosmétiques, ou comme agents tensio-actifs en vrac, par exemple pour des produits de nettoyage. Pour les produits de haute pureté, le coût de la production est affecté principalement par le traitement en aval. Toutefois, si une haute pureté n'est pas nécessaire, par exemple pour des applications en vrac, les coûts des matières premières peuvent représenter jusqu'à 50% du coût total de production. Il a été rapporté que le rendement moyen des rhamnolipides par unité de gramme de substrat dans les cultures en cuve varie de 0,1 à 0,62 ( $Y_{P/S}$ ) g RL/g substrat (Müller *et al.*, 2012). Ceci, implique que dépendamment du substrat et du processus, beaucoup plus (environ 10 fois plus) de substrat sera consommé par rapport aux rhamnolipides synthétisés. Donc, l'utilisation de déchets industriels, de déchets organiques d'industries agroalimentaires, ou de substrats renouvelables à faible coût peut conduire à une réduction significative du coût de production (Makkar *et al.*, 2002, Mukherjee *et al.*, 2006, Nitschke *et al.*, 2003, Noah *et al.*, 2005).

Bien qu'il existe une large gamme de substrats ayant été employés pour la production de rhamnolipides par *P. aeruginosa*, allant de substances dérivées de la pétrochimie jusqu'à des substrats d'origine naturelle, les substrats les plus couramment utilisés sont les huiles végétales, les sucres et le glycérol (Banat *et al.*, 2014). Parmi les huiles végétales, l'huile de tournesol (Benincasa *et al.*, 2002) et l'huile de soja (Abalos *et al.*, 2001) présentent une bonne capacité pour la production de rhamnolipides et ont été utilisés pour la production des rhamnolipides par *P. aeruginosa* (Rahman *et al.*, 2002). Également, les substrats amylacés comme les eaux usées issues du traitement du manioc ont été utilisés en tant que substrats intéressants pour la production de rhamnolipides (Costa *et al.*, 2009, Costa *et al.*, 2010).

Éventuellement, les substrats dérivés de résidus industriels peuvent devenir plus importants, car ils sont généralement moins chers, ne sont pas en concurrence directe avec de la nourriture, et ils maximisent l'efficacité de l'utilisation en ce qui concerne l'ensemble du processus de production. En outre, l'utilisation de résidus industriels pour les procédés biotechnologiques peut également se révéler bénéfique pour l'environnement (Henkel *et al.*, 2012).

#### **1.1.6.2 Développement de bioprocédé**

Un bioprocédé efficace et économique est le fondement de base pour toute l'industrie de la biotechnologie rentable. Par conséquent, le développement de bioprocédés est la première étape vers la commercialisation de tout produit biotechnologique, y compris des biosurfactants tels que les rhamnolipides. Toute tentative primaire d'augmenter le rendement des rhamnolipides requiert l'optimisation de la composition du milieu et la sélection des conditions de culture optimales qui induiront la productivité optimale. De même, des techniques efficaces de traitement en aval sont nécessaires pour la récupération maximale du produit.

##### **1.1.6.2.1 Optimisation du milieu et des conditions de culture par la méthode des plans d'expériences**

L'optimisation de la production de rhamnolipides à un coût réduit exige l'utilisation de stratégies d'optimisation des processus qui impliquent de multiples facteurs. La méthode classique d'optimisation consiste à modifier une variable à la fois, tout en gardant les autres à des niveaux fixes. Cependant, lorsque le nombre des facteurs à explorer est élevé, cette méthode

est laborieuse, prend du temps et ne garantit pas la détermination des conditions optimales de production car elle ne considère pas l'interaction possible entre les facteurs.

Ainsi, afin d'optimiser la réponse d'un système lorsque la nature de l'interaction entre les variables indépendantes et dépendantes n'est pas connue, nous devons approcher la fonction inconnue avec un modèle empirique approprié. Pour faire face à ce problème, l'approche statistique basée sur la méthodologie de surface de réponse (MSR) qui est une combinaison de plan d'expérience statistique, de techniques de modélisation de régression et de techniques d'optimisation mathématique s'avère être efficace pour rendre le processus d'optimisation plus précis et raffiné (Montgomery, 2008).

Cette méthode a été utilisée pour déterminer la composition optimale du milieu de culture, l'âge de l'inoculum et les conditions environnementales pour une production améliorée de surfactine par *Bacillus subtilis* (Sen *et al.*, 1997, Sen *et al.*, 2004). Plusieurs études ont également appliquée la MSR pour améliorer la production de rhamnolipides par différentes souches de *P. aeruginosa* (Abalos *et al.*, 2002, Deepika *et al.*, 2016, Wei *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2014). Ces méthodes d'optimisation aideraient l'industrie à concevoir les meilleurs milieux de cultures avec des substrats moins chers et en utilisant des conditions environnementales les plus favorables pour améliorer la production des biosurfactants.

#### **1.1.6.2.2 Stratégies de culture**

En dehors de l'optimisation du milieu de culture, la stratégie de culture et les conditions opératoires telles que l'aération, l'agitation, le pH et la température doivent être choisis avec soin pour obtenir une production optimale de rhamnolipides (Zhu *et al.*, 2012).

Généralement, toutes les stratégies de culture pour la production de rhamnolipides visent à limiter au moins un composant du milieu comme la source d'azote ou d'ions multivalents et en même temps, garder un excès de source de carbone. Ces conditions limitantes peuvent être maintenues par les stratégies de culture suivante (Lang *et al.*, 1999) :

1. Culture cuvée alimentée, dans des conditions limitant la croissance (Chen *et al.*, 2007, Gianì *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 2004, Zhu *et al.*, 2012)
2. Culture en cuvée avec cellules au repos (Syldatk *et al.*, 1985)
3. Culture semi-continue avec des cellules immobilisées (Jeong *et al.*, 2004, Siemann *et al.*, 1993)

4. Culture continue dans des conditions limitantes avec un taux de croissance ralentie (Guerra-Santos *et al.*, 1984, Guerra-Santos *et al.*, 1986, Reiling *et al.*, 1986)

#### **1.1.6.2.3 Optimisation des processus de traitement en aval**

Même si la production optimale est obtenue en utilisant des conditions de milieux et de culture optimales, le processus de production est encore incomplet sans avoir un moyen efficace et économique pour la récupération des produits. Ainsi, un facteur important pour déterminer la faisabilité d'un processus de production à l'échelle commerciale est la disponibilité de la récupération et les procédures appropriées et économiques en aval (Mukherjee *et al.*, 2006). Pour de nombreux produits biotechnologiques, les coûts de traitement en aval représentent 60% des coûts totaux de production. Ainsi, de nombreux facteurs peuvent influencer les coûts de récupération de rhamnolipides, par exemple la concentration du produit, les caractéristiques du bouillon de culture et du produit, la pureté désirée et les méthodes de récupération sélectionnées (Mukherjee *et al.*, 2006). Plusieurs méthodes classiques pour la récupération de rhamnolipides, tel que précipitation par l'acide ou le sulfate d'aluminium, extraction par solvant, la cristallisation, ont été largement rapportées dans la littérature (Heyd *et al.*, 2008).

Quelques méthodes de récupération non conventionnelles et intéressantes ont également été rapportées au cours des dernières années. Ces procédures prennent avantage de quelques-unes des autres propriétés des rhamnolipides - telles que leur activité de surface ou leur capacité à former des micelles et/ou vésicules - et sont particulièrement applicables à la récupération continue à partir de bouillons de culture à grande échelle. Quelques exemples de ces stratégies comprennent le fractionnement de la mousse (Heyd *et al.*, 2011, Sarachat *et al.*, 2010), l'ultrafiltration (Long *et al.*, 2012, Witek-Krowiak *et al.*, 2011), l'adsorption-désorption sur des résines de polystyrène et la chromatographie par échange d'ions (Reiling *et al.*, 1986), et adsorption-désorption sur charbon activé (Dubey *et al.*, 2005). L'un des principaux avantages de ces méthodes est leur capacité à fonctionner dans un mode continu pour la récupération des rhamnolipides avec un haut niveau de pureté (Heyd *et al.*, 2008). D'autres recherches sont nécessaires dans ce domaine pour améliorer ces étapes de traitement en aval et les rendre plus rentables.

### 1.1.6.3 Amélioration et développement de souches surproductrices

Le processus de production à l'échelle industrielle est souvent dépendant de l'utilisation de souches microbiennes surproductrices. Même avec des matières premières très bon marché, les conditions de cultures optimisées et des procédés de récupération efficaces, un processus de production ne peut pas être commercialement viable et rentable jusqu'à ce que le rendement du produit final soit naturellement élevé par les souches productrices. Dans le cas où les souches productrices naturelles n'offrent pas un bon rendement, des souches surproductrices peuvent être développées par mutagenèse aléatoire ou par une mutagenèse dirigée par génie génétique. Par exemple, la biologie des systèmes est une approche intéressante qui peut être appliquée pour améliorer la production de rhamnolipides en augmentant les flux métaboliques vers le produit et à réduisant la formation de métabolites indésirables (Müller *et al.*, 2012).

### 1.1.7 Producteurs de rhamnolipides autres que *P. aeruginosa*

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* est traditionnellement considéré comme étant le principal producteur de rhamnolipides. Cependant, étant donné que *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste pour l'Homme (niveau P2 de biosécurité) et ceci peut représenter un risque pour les personnes immunodéficientes, cette espèce bactérienne ne constitue pas le choix idéal pour une production industrielle à grande échelle.

Donc, de nombreux groupes de recherche ont dédié leur travail à trouver des espèces/souches alternatives pour la production de rhamnolipides. Il existe deux stratégies principales qui sont étudiées pour contourner ce problème: la production hétérologue de rhamnolipides dans des souches non pathogènes (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006, Cha *et al.*, 2008, Ochsner *et al.*, 1995b) et la production de rhamnolipides par des bactéries non pathogènes, en recherchant des souches alternatives (Abouseoud *et al.*, 2008, Christova *et al.*, 2004, Costa *et al.*, 2011, Gunther *et al.*, 2005, Rooney *et al.*, 2009). Cependant, dans le cas de la production hétérologue de rhamnolipides, aucune des souches recombinantes n'a démontré une production de rhamnolipides au niveau de *P. aeruginosa*. Cela est attribué à l'absence d'une compréhension complète des facteurs biosynthétiques et génétiques régulant la production de rhamnolipides. Dans le cas de production hétérologue chez *Pseudomonas putida*, la production plus faible par rapport à *P. aeruginosa* peut être expliquée par une production insuffisante du précurseur dTDP-L-rhamnose, le substrat nécessaire à la rhamnosyltransférase (Cha *et al.*, 2008). Cela montre que la compréhension complète du flux métabolique des précurseurs au sein de la souche



hétérologue serait cruciale pour l'élaboration d'une stratégie d'ingénierie métabolique efficace pour la production de rhamnolipides dans des souches hétérologues.

Au cours des dernières années, plusieurs autres espèces bactériennes ont été rapportées capables de produire des rhamnolipides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Pourtant, en dehors de quelques cas précis, il semblerait que la capacité à produire des rhamnolipides soit restreinte à un nombre limité d'espèces appartenant étroitement aux genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Walter *et al.*, 2009).

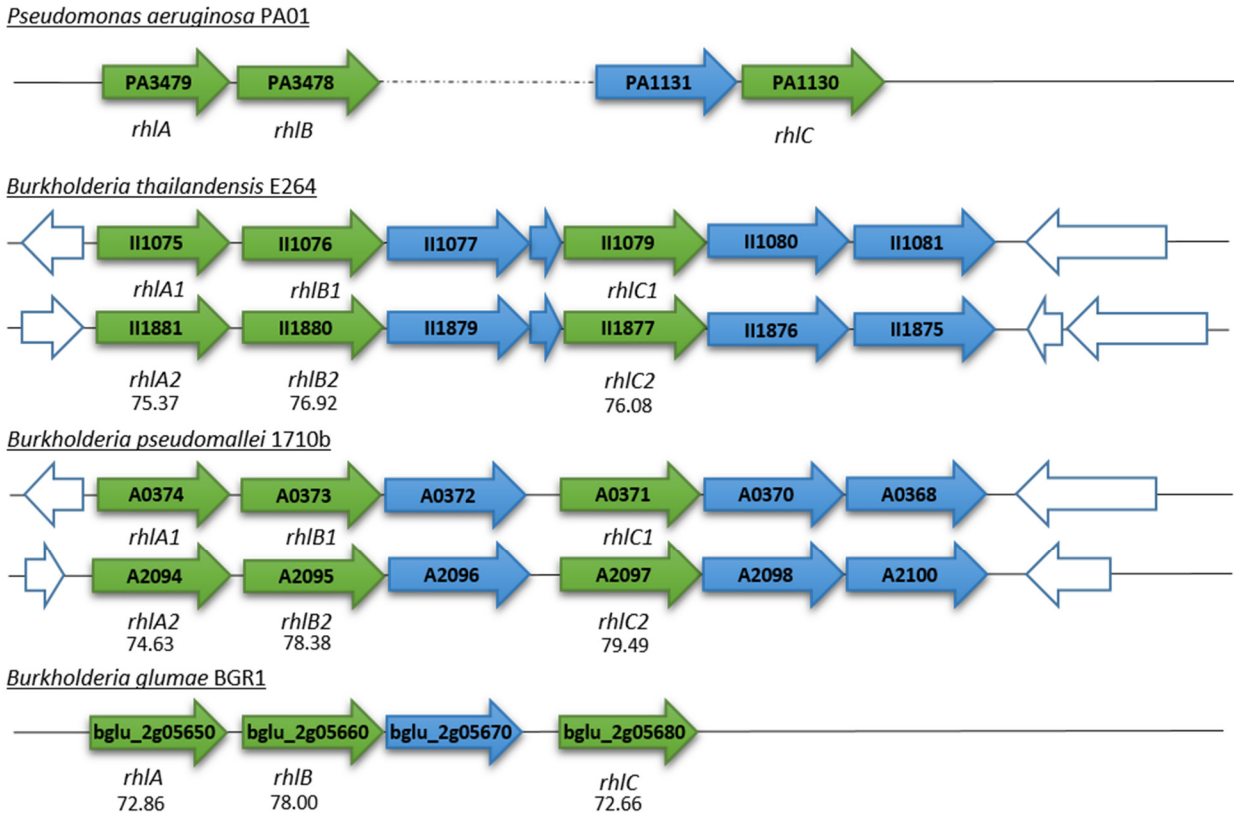
La création du genre *Burkholderia* remonte à 1992 lorsque, en se basant sur la séquence nucléotidique des ARNr 16S, sur les homologues de séquence ADN-ADN, sur la composition lipidique et sur les caractéristiques phénotypiques, sept espèces appartenant au groupe d'homologie II du genre *Pseudomonas* ont été reclassées dans le nouveau genre *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1993). Depuis lors, le nombre d'espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* a considérablement augmenté avec le transfert d'autres espèces bactériennes au genre et avec l'identification de nouvelles espèces. Actuellement, au moins 101 espèces sont répertoriées dans le genre *Burkholderia* (<http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>). Plusieurs d'entre elles ont des caractéristiques similaires aux bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*, et quelques-unes produisent aussi des rhamnolipides. Parmi celles-ci se trouvent l'agent pathogène des mammifères *Burkholderia pseudomallei* (Dubeau *et al.*, 2009, Haussler *et al.*, 1998), son homologue non pathogène, *Burkholderia thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009), et les deux bactéries phytopathogènes *Burkholderia plantarii* (Andra *et al.*, 2006, Hörmann *et al.*, 2010) et *Burkholderia glumae* (Costa *et al.*, 2011, Pajarron *et al.*, 1993).

Puisque *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste, une autre espèce non pathogène (niveau 1 de biosécurité) comme, par exemple, les producteurs de rhamnolipides du genre *Burkholderia*, tel que *B. glumae*, représenterait une alternative très intéressante. Cependant, les conditions de culture permettant la production de quantités significatives et suffisantes de rhamnolipides devront être préalablement définies. Or, en dépit des avantages apparents que présentent ces producteurs alternatifs de rhamnolipides, la biosynthèse des rhamnolipides chez ces espèces bactériennes est encore très peu connue. En outre, des études récentes dans le laboratoire Déziel proposent différents mécanismes de régulation de la production des rhamnolipides chez les bactéries du genre *Burkholderia* (Costa *et al.*, 2011, Dubeau *et al.*, 2009).

### 1.1.8 Biosynthèse des rhamnolipides chez *Burkholderia* spp.

Contrairement à *P. aeruginosa*, les souches productrices de rhamnolipides du genre *Burkholderia* produisent essentiellement des di-rhamnolipides avec deux chaînes de C<sub>14</sub>. Haussler *et al.* (1998) ont, pour la première fois, purifié et caractérisé un glycolipide chez *B. pseudomallei* et celui-ci a été identifié comme étant le 2-O- $\alpha$ -L- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-L- $\beta$ -rhamnopyranosyl-hydroxytétradécanoyle- $\beta$ -hydroxytétradécanoate (Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>). D'autres rhamnolipides ont été retrouvés chez *B. plantarii*, qui produit un mélange de trois rhamnolipides et plus particulièrement le Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> également (Andra *et al.*, 2006). Dubeau *et al.* (2009) ont identifié la troisième espèce bactérienne appartenant au genre *Burkholderia* productrice de rhamnolipides, *B. thailandensis*. Ils ont constaté que les gènes orthologues aux gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC* de *P. aeruginosa* chez *B. thailandensis* E264 et *B. pseudomallei* 1710B sont regroupés dans un locus. Chez *P. aeruginosa*, seuls les gènes *rhIA* et *rhIB* sont regroupés, tandis que *rhIC* est situé dans un autre opéron (Figure 1.5). Ils ont également observé que *B. thailandensis* synthétise essentiellement des di-rhamnolipides avec deux chaînes de C<sub>14</sub>, ce qui semble donc être une caractéristique commune aux bactéries du genre *Burkholderia*. Les auteurs ont, en effet, confirmé un rapport di-rhamnolipide/mono-rhamnolipide plus élevé chez ces espèces, par rapport à ce qui est observé chez *P. aeruginosa* (Dubeau *et al.*, 2009). Ceci est probablement dû au fait que chez *B. thailandensis*, l'enzyme rhamnosyltransférase II (codée par *rhIC*) peut avoir une affinité significativement plus élevée pour son substrat que la même enzyme chez *P. aeruginosa*, ce qui peut se traduire par une conversion plus rapide de tous les précurseurs mono-rhamnolipides en di-rhamnolipides et donc à une production prédominante de di-rhamnolipides que l'on peut observer chez *B. thailandensis* (Funston *et al.*, 2016). Sans surprise, l'étude réalisée par Hörmann *et al.* (2010) a permis d'identifier le principal rhamnolipide produit par *B. plantarii* 9509T DSM: le Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>.

Une autre chose intéressante à propos de *B. thailandensis* et de *B. pseudomallei* est que, chez ces deux espèces, le chromosome contient deux copies identiques de la succession de gènes *rhl* (Figure 1.5) (Dubeau *et al.*, 2009).



**Figure 1.5** Représentation schématique de l'agencement génétique des opérons *rhl* de *P. aeruginosa* PAO1, *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 1710b et *B. glumae* BGR1.

Les régions bicistroniques de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 contenant les gènes *rhlA*B et *rhlC* ainsi que les homologues aux gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* chez *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 1710b et *B. glumae* BGR1. Les valeurs représentent les pourcentages d'identité des séquences *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* par rapport à leurs orthologues chez *P. aeruginosa* PAO1. Figure adaptée de Dubeau *et al.* (2009).

Récemment, la production de rhamnolipides chez *B. glumae* AU6208 a été caractérisée en détail (Costa *et al.*, 2011). Dans cette étude, les congénères mono- et di-rhamnolipides ont été détectés grâce à une analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM). Le congénère prédominant était le Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> avec des valeurs allant de 53% à 63% selon les conditions de culture testées. Le séquençage complet du génome de *B. glumae* BGR1 (Lim *et al.*, 2009) a permis l'identification d'une seule succession de gènes *rhl* chez cette espèce bactérienne (Figure 1.5) (Costa *et al.*, 2011). Ces résultats, et en considérant le fait que *B. glumae* est déjà utilisée pour la production à l'échelle industrielle d'une lipase (Boekema *et al.*, 2007), suggèrent que cette bactérie est une candidate potentielle pour la production industrielle des rhamnolipides. De ce fait, l'élucidation des mécanismes qui contrôlent la production des rhamnolipides chez cette espèce est primordiale.

### 1.1.9 *Burkholderia glumae*

*B. glumae* est une bactérie à Gram négatif, aérobie et mobile grâce à des flagelles polaires. Elle se présente sous la forme d'un bacille, avec une taille variant entre 1,5 et 2,5 µm. Elle est capable de croître à des températures allant de 11 à 40°C (la température optimale se situant autour 30 à 35°C). Enfin, elle possède 6 réplicons comportant deux chromosomes et quatre plasmides (Tableau 1.1) avec une teneur en GC de son ADN total de 68,2% (Brenner *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2016, Schaad *et al.*, 2001).

**Tableau 1.1 Organisation génomique du *B. glumae* BGR1**

Chromosome 1	3,906,507 bp (3493 gènes)
Chromosome 2	2,827,333 bp (2286 gènes)
Plasmide 1	133,591 bp (144 gènes)
Plasmide 2	141,792 bp (121 gènes)
Plasmide 3	141,067 bp (143 gènes)
Plasmide 4	134,346 bp (115 gènes)
Totale	7,284,636 bp (6302 gènes)

*B. glumae* est un agent pathogène des plantes causant, notamment, une infection bactérienne des panicules du riz qui est transmise par les semences infectées (Hikichi *et al.*, 1993). Au Japon, où elle est responsable de la maladie la plus importante du riz, cette bactérie a été décrite comme étant l'agent étiologique d'une maladie provoquant la pourriture des graines ainsi que la décomposition des semences (Ham *et al.*, 2011). Aux États-Unis, elle a été identifiée comme étant le principal agent responsable de la pourriture des panicules du riz (Nandakumar *et al.*, 2005).

La réduction du rendement du riz qui découle de la pourriture des panicules peut atteindre jusqu'à 75% dans les champs fortement affectés en raison de la réduction du poids du grain, de la stérilité des fleurs et de l'inhibition de la germination des grains (Ham *et al.*, 2011). La transmission d'année en année de l'agent pathogène *B. glumae* dans les semences peut aussi contribuer à des pertes de rendement.

La gamme d'hôtes de *B. glumae* ne se limite pas au riz. En effet, Jeong *et al.* (2003) ont observé que *B. glumae* est capable d'infecter d'autres plantes, comme le poivron, l'aubergine, le sésame et la tomate, en provoquant le flétrissement bactérien.

### 1.1.10 Facteurs de virulence de *B. glumae*

La toxoflavine et une lipase sont actuellement reconnues pour être les principaux facteurs de virulence de *B. glumae*. Les mutants déficients dans la production de la toxoflavine et de cette lipase sont pratiquement avirulents (Devescovi *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2004). La toxoflavine, une phytotoxine non spécifique de l'hôte, est un transporteur d'électrons très efficace qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (Sato *et al.*, 1989). Les cellules de *B. glumae* expriment un système pour détoxifier les ROS générés soit par la toxoflavine soit par les défenses de l'hôte sur les sites d'infection. Ainsi, l'enzyme KatG code pour une catalase capable de protéger contre le stress oxydatif et de fonctionner comme un facteur de virulence (Chun *et al.*, 2009).

*B. glumae* possède également d'autres facteurs de virulence que l'on retrouve couramment chez de nombreuses bactéries phytopathogènes comme, par exemple, le système de sécrétion de type III (T3SS), des polygalacturonases, des exopolysaccharides de surface ainsi que la motilité flagellaire (Ham *et al.*, 2011). Kim *et al.* (2007) ont constaté que les flagelles polaires sont responsables d'au moins deux types de motilité bactérienne chez *B. glumae*: les motilités de type « *swimming* » et de type « *swarming* ». Ils ont également observé que tous les mutants de *B. glumae* défectueux dans la biogenèse flagellaire montrent des phénotypes non mobiles et sont quasiment avirulents, ce qui suggère que la motilité flagellaire est un mécanisme essentiel à la pathogénicité de *B. glumae* (Kim *et al.*, 2007).

### 1.1.11 QS chez *B. glumae*

Chez les bactéries phytopathogènes, la production des facteurs de virulence tels que les exopolysaccharides de surface, les enzymes de dégradation ou les composants impliqués dans le transfert du plasmide Ti, sont contrôlés par le QS médié par des AHL (Von Bodman *et al.*, 2003).

Chez *B. glumae*, une synthase de type LuxI nommée TofI est responsable de la biosynthèse des molécules de signalisation *N*-hexanoyl-L-homosérine lactone (C<sub>6</sub>-HSL) et *N*-octanoyl-L-homosérine lactone (C<sub>8</sub>-HSL). La C<sub>8</sub>-HSL interagit spécifiquement avec le régulateur transcriptionnel de type LuxR nommé TofR (Kim *et al.*, 2004). Le complexe TofR-C<sub>8</sub>-HSL se lie alors à une séquence palindromique appelé boîte *lux* (ou *tof*) située dans la région promotrice du

gène *tofl*. De ce fait, la transcription de *tofl* est sous le contrôle de TofR et ainsi, le système est autoinductible (Figure 1.6) (Kim *et al.*, 2004).

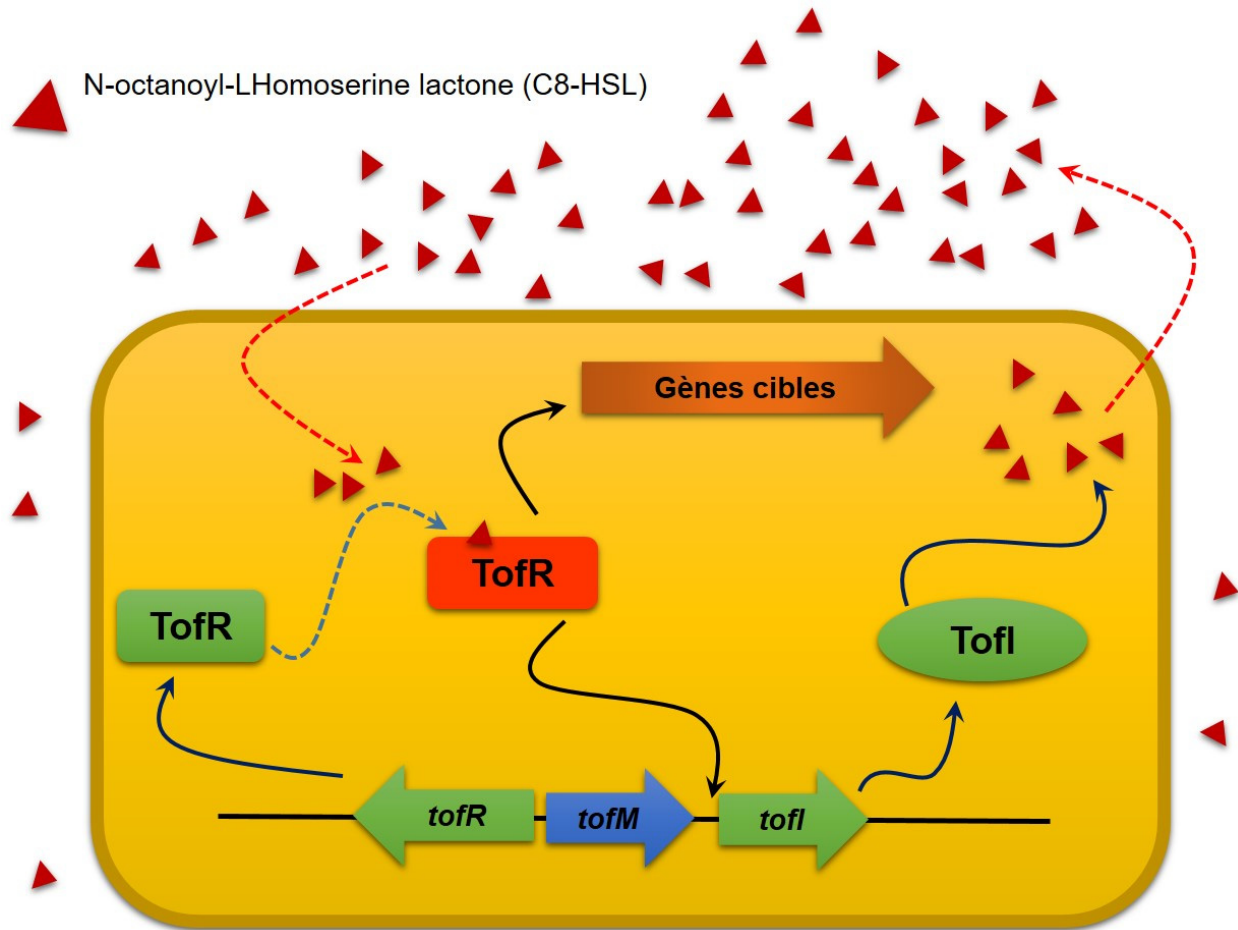


Figure 1.6 Schéma de système de QS *tof* chez *B. glumae* BGR1.

La production de facteurs de virulence tels que la toxoflavine et la lipase est sous le contrôle du QS (Devescovi *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2004). La génétique de la régulation de la production de la toxoflavine est particulièrement bien étudiée chez *B. glumae*. Kim *et al.* (2004) ont constaté que ToxR, régule à la fois l'expression de l'opéron *toxABCDE* et de l'opéron *toxFGHI* en présence de toxoflavine qui joue le rôle de co-inducteur. En outre, ils ont montré que la régulation génique de ces deux opérons implique également l'activateur transcriptionnel ToxJ, dont l'expression du gène correspondant est régulée par le QS. L'expression du gène *toxJ* est, en effet, induite par le régulateur transcriptionnel TofR lorsque celui-ci se lie à son auto-inducteur C<sub>8</sub>-HSL (Kim *et al.*, 2004). Cependant, Chen *et al.* (2012) ont observé que bien que des mutants du QS *tofl*<sup>-</sup> et *tofR*<sup>-</sup> soient dépourvus de production de toxoflavine dans le milieu LB, cette capacité à produire le toxoflavine n'est pas perdue lorsque les mutants sont cultivés en milieu solide (sur

gélose solidifiée avec agar). Ceci suggère la présence d'un autre facteur régulant la production de toxoflavine indépendamment du système TofR/TofI. En fait, la découverte d'un cadre de lecture ouvert situé dans la région intergénique entre *tofl* et *tofR* s'est avérée essentielle pour la production de toxoflavine par les mutants *tofl*<sup>-</sup> et *tofR*<sup>-</sup> sur les milieux solides. Ce nouveau facteur régulateur de *B. glumae* BGR1 est nommé *tofM*, d'après son homologue *rsaM* récemment identifié comme un nouveau gène de régulation négative du QS chez la bactérie pathogène de riz *Pseudomonas fuscovaginae* (Chen *et al.*, 2012, Choudhary *et al.*, 2013). Récemment, en effectuant une mutagenèse aléatoire et un criblage chez des mutants affectés dans la production de toxoflavine chez *B. glumae*, Chen *et al.* (2015) ont identifié les composants génétiques potentiels impliqués dans la régulation indépendante de QS. En particulier, les gènes connus pour avoir d'autres fonctions, *flhDC*, *dgcB*, *wzyB*, and *qsmR*, ainsi qu'un gène à la fonction inconnue, nommé *toxK*, ont été impliqués dans la production de la toxoflavine indépendamment de *tofl* et *tofR* (Chen *et al.*, 2015).

La synthèse des flagelles et, par conséquent la motilité sont également dépendantes du système de QS TofI/TofR médié par la molécule de signalisation C<sub>8</sub>-HSL (Kim *et al.*, 2007). Dans cette même étude, d'autres facteurs de régulation qui régissent la motilité, comme par exemple, les régulateurs transcriptionnels de type IclR, QsmR et FlhD/FlhC, ont été découverts (Kim *et al.*, 2007).

Goo *et al.* (2010) ont effectué une analyse protéomique du QS chez *B. glumae*. Ils ont réalisé une étude comparative des protéines extracellulaires et cellulaires des souches BGR1 et BGS2 qui correspondent respectivement à la souche sauvage et au mutant QS *tofl*<sup>-</sup>, et ils ont identifié des protéines dépendantes du QS. Ces protéines sont impliquées dans diverses fonctions comme, par exemple, l'adhérence cellulaire (Goo *et al.*, 2010).

Le QS pourrait également induire des fonctions importantes qui sont nécessaires pour la survie dans les conditions à haute densité telle que la phase stationnaire. Les résultats rapportés par Goo *et al.* (2012) ont démontrés que chez *B. glumae*, le QS permet aux individus d'anticiper et de survivre au stress de la phase stationnaire. Cette survie exige l'activation QS-dépendantes des enzymes nécessaires à la production d'acide oxalique. Ce dernier, une fois excrété, neutralise l'alcalinité induite par l'ammoniaque au cours de la phase stationnaire (Goo *et al.*, 2012, Oh *et al.*, 2014). D'une façon similaire, l'expression des gènes qui codent pour les protéines universelles du stress est également sous le contrôle du système TofIR (Kim *et al.*, 2012). D'ailleurs, l'implication du système QS TofIR dans l'acquisition des nutriments montre également le rôle important que le QS joue dans l'optimisation de l'énergie et l'utilisation des ressources au

sein d'une population bactérienne dans les conditions limitantes et de surpeuplement (An *et al.*, 2014, Goo *et al.*, 2015).

En outre, l'équipe du Dr Hwang a utilisé l'approche ARN-seq pour analyser les gènes dont l'expression est régulée *via* le QS chez *B. glumae* BGR1 et chez deux mutants défectueux dans le QS, BGS2 (BGR1 *tofl::Ω*) et BGS9 (BGR1 *qsmR::Ω*) (Kim *et al.*, 2013). Cette analyse a été réalisée dans deux conditions de culture différentes : une culture liquide de 6 heures (avant l'activation du QS) et une culture liquide de 10 heures (après l'activation du QS). En comparant le profil d'expression génique chez la souche sauvage BGR1 et les deux mutants avant et après l'activation du QS, ils ont pu identifier 1133 et 840 gènes qui sont régulés d'une manière dépendant par *Tofl* et *QsmR*, respectivement. L'enrichissement de l'ontologie génique (GO) a révélé les cascades uniques et partagées de signalisation entre *Tofl* et *QsmR*. L'analyse GO a révélé que les gènes impliqués dans la régulation de la transcription, la réponse aux stress (oxydatif), et le transport sont surreprésentés parmi les gènes dépendant de *Tofl* ou *QsmR*. Les gènes impliqués dans le repliement et la sécrétion de protéines sont spécifiquement surreprésentés parmi les gènes régulés par *QsmR* (Kim *et al.*, 2013).

Les résultats de RNA-seq rapportés par Kim *et al.* (2013) montrés que les termes GO liés à motilité, y compris l'assemblage du flagelle et la motilité sont très riches en gènes dépendant de *Tofl*, mais pas dans ceux qui sont dépendant de *QsmR*. Sachant que la régulation de *flhDC* pour la motilité bactérienne chez *B. glumae* dépend de *QsmR* (Kim *et al.*, 2007), ces résultats suggère que *Tofl* peut réguler la motilité non seulement par la régulation de *flhDC* qui dépend de *QsmR* (Kim *et al.*, 2007) mais aussi par d'autres voies de signalisation. Cette notion a également été soutenue par le fait que l'une des voies de dégradation d'acides aminés, la dégradation de l'arginine II (voie de l'arginine succinyltransférase) et de la  $\beta$ -oxydation I des acides gras régulée par QS, a été directement ou indirectement impliquée dans la motilité du type « *swarming* » (Kim *et al.*, 2013).

### 1.1.12 Hypothèses de travail et objectifs

Les travaux présentés dans cette thèse s'intègrent dans une stratégie globale qui vise à optimiser la production des rhamnolipides par des bactéries utilisables à grande échelle et qui présentent une innocuité pour les humains et les animaux. Il s'agit de trouver une alternative valable à *P. aeruginosa*, le meilleur producteur connu de rhamnolipides, mais un pathogène opportuniste notoire pour l'humain. Il a été récemment déterminé que *B. glumae* constitue un



excellent candidat. Les travaux menés conjointement dans les laboratoires des professeurs Eric Déziel et François Lépine ont montré que ce phytopathogène peut produire des quantités appréciables de rhamnolipides.

Étant donné que nos connaissances concernant la production et le mécanisme de régulation des rhamnolipides chez *B. glumae* étaient limitées et incomplètes, la finalité de cette thèse a visé l'élucidation des mécanismes contrôlant la biosynthèse des rhamnolipides chez cette espèce bactérienne afin d'optimiser la production de ces biosurfactants.

Par ailleurs, la fonction spécifique des rhamnolipides chez *B. glumae* était également inconnue. Des études précédentes avaient démontré que, à 37°C, bien que la souche sauvage soit mobile et capable de présenter la motilité de type « *swimming* » et « *swarming* », ces deux phénotypes sont fortement réduits chez le mutant *tofl* (Kim *et al.*, 2007). Cependant, lorsque le mutant de QS est cultivé à 28°C, il conserve ses flagelles et récupère le « *swimming* », mais il reste incapable de faire du « *swarming* » (Kim *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent qu'à part les flagelles, un autre facteur est essentiel pour la motilité de type « *swarming* » chez *B. glumae*. De ce fait, compte tenu que les rhamnolipides sont également nécessaires à la motilité de type « *swarming* » chez *P. aeruginosa*, il est possible que la perte de « *swarming* » chez le mutant *tofl* soit liée à la perte de production des rhamnolipides.

Ainsi, dans le cadre de mes études de doctorat, nous avons émis une hypothèse principale qui a été le fil conducteur tout au long de ces travaux :

- Le QS constitue le mécanisme de régulation contrôlant la biosynthèse des rhamnolipides chez *B. glumae*

Afin de répondre à cette hypothèse nous nous sommes fixés trois objectifs principaux :

Objectif 1: Déterminer la fonction des rhamnolipides chez *B. glumae* :

- Implication dans la motilité de type « *swarming* »?

Objectif 2: Identifier les facteurs contrôlant la production des rhamnolipides chez *B. glumae* :

- Régulation génique
- Facteurs environnementaux et nutritionnels

Objectif 3: Optimiser la production des rhamnolipides chez *B. glumae*

## 2 PUBLICATIONS

## 2.1 Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids

Arvin Nickzad, François Lépine and Éric Déziel\*

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

**Journal :** PLOS ONE

**Soumission :** février 9, 2015

**Acceptation :** avril 29, 2015

**Publication :** juin 05, 2015

**DOI :** 10.1371/journal.pone.0128509

**Citation:** Nickzad A, Lépine F, Déziel E (2015) Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. PLoS ONE 10(6): e0128509. doi:10.1371/journal.pone.0128509

**Contribution :** Nickzad, Dr. Lépine et Dr. Déziel ont conçu et développé les expériences. Nickzad a effectué les expériences. Nickzad et Dr. Déziel ont analysé les données. Nickzad a écrit le manuscrit et Dr. Déziel a révisé le manuscrit. Dr. Lépine et Dr. Déziel ont Fourni les réactifs, les matériaux et les outils d'analyse.

## Résumé

*Burkholderia glumae* est une bactérie phytopathogène qui utilise le système de « *Quorum sensing* » (QS) de type LuxR/LuxI nommé TofI/TofR afin de réguler l'expression de diverses fonctions, y compris ses principaux facteurs de virulence tels que la toxoflavine et les flagelles. Cette bactérie produit également des rhamnolipides qui sont des agents tensioactifs. Chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia thailandensis*, les rhamnolipides avec les flagelles sont requis pour la motilité sociale nommée « *swarming* ». Dans cette étude, nous démontrons que le QS régule positivement la production de rhamnolipides chez *B. glumae* et que les rhamnolipides sont également nécessaires pour la motilité du type « *swarming* » chez cette espèce. Nous montrons qu'un mutant *rhlA*<sup>-</sup>, qui est incapable de produire les rhamnolipides, perd sa capacité à faire du « *swarming* », et qu'il récupère le « *swarming* » lors de l'ajout de rhamnolipides exogènes. Nos résultats suggèrent que la perte de production des rhamnolipides chez un mutant déficient en QS est le facteur principal responsable de la perte de sa motilité du type « *swarming* ».

### 2.1.1 Abstract

*Burkholderia glumae* is a plant pathogenic bacterium that uses an acyl-homoserine lactone-mediated quorum sensing system to regulate protein secretion, oxalate production and major virulence determinants such as toxoflavin and flagella. *B. glumae* also releases surface-active rhamnolipids. In *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*, rhamnolipids, along with flagella, are required for the social behavior called swarming motility. In the present study, we demonstrate that quorum sensing positively regulates the production of rhamnolipids in *B. glumae* and that rhamnolipids are necessary for swarming motility also in this species. We show that a *rhlA*<sup>-</sup> mutant, which is unable to produce rhamnolipids, loses its ability to swarm, and that this can be complemented by providing exogenous rhamnolipids. Impaired rhamnolipid production in a quorum sensing-deficient *B. glumae* mutant is the main factor responsible for its defective swarming motility behaviour.

### 2.1.2 Introduction

*Burkholderia glumae* is a notorious phytopathogen of rice that uses a LuxI/LuxR-type quorum sensing (QS) system to regulate diverse cellular processes such as protein secretion, oxalate production and expression of major known virulence factors such as toxoflavin, lipase,

KatG and flagella (Chun *et al.*, 2009, Devescovi *et al.*, 2007, Goo *et al.*, 2010, Goo *et al.*, 2012). In *B. glumae*, the TofR QS regulator is activated by the *N*-octanoyl homoserine lactone (C8-HSL) autoinducer, the product of the TofI *N*-acyl homoserine lactone synthase, to control the expression of the target genes (Kim *et al.*, 2004).

Among major virulence determinants of *B. glumae*, flagellum-driven motility plays a critical role in its pathogenicity (Devescovi *et al.*, 2007). Besides swimming motility, this bacterium is also able to spread by a social motility behaviour called swarming motility, which typically requires both functional flagella and production of a surface-wetting agent (surfactant) (Kearns, 2010). Since swarming is a multicellular behaviour, in many bacteria it is dependent on QS regulation (Daniels *et al.*, 2004). QS modulates swarming motility by diverse mechanisms, either by regulating the flagellar machinery and propulsive force, or by inducing the expression of wetting agent biosynthesis pathways (Partridge *et al.*, 2013). For instance, in *B. glumae*, QS positively regulates the expression of flagellar biosynthesis genes, which are essential for swarming motility (Devescovi *et al.*, 2007). Furthermore, in *B. glumae*, growth temperature also regulates flagellar morphogenesis (Jang *et al.*, 2014). Indeed, while a QS-deficient mutant is aflagellated at 37°C and thus does not exhibit swarming nor swimming motilities, it retains normal flagella and motility at 28°C, which shows that flagellum formation requires QS at 37°C but not at 28°C (Devescovi *et al.*, 2007). The wetting agent allowing swarming motility of *B. glumae* has not been identified yet. In some swarming bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*, this social motility behaviour is promoted by the production of rhamnolipids (Dubeau *et al.*, 2009, Köhler *et al.*, 2000, Tremblay *et al.*, 2007). We have previously reported that *B. glumae* also is capable of rhamnolipids production and carries a *rhl* operon homologous to those responsible for rhamnolipid biosynthesis in *B. thailandensis*, *Burkholderia pseudomallei* and *P. aeruginosa* (Costa *et al.*, 2011).

Here we investigate the regulation and role of rhamnolipids in *B. glumae*. We confirm that a *rhlA*<sup>-</sup> mutant which lacks rhamnolipid production completely loses its ability to swarm. Furthermore, we show that QS positively regulates rhamnolipid production, and thus swarming motility. Importantly, although QS is necessary for flagellar motility at 37°C, our results demonstrate that the observed regulation solely goes through rhamnolipid production. Given that QS regulates many virulence determinants in *B. glumae*, such as flagellar motility, rhamnolipids, as factors involved in surface-associated motility might contribute to the pathogenicity of this bacterium.

## 2.1.3 Materials and methods

### 2.1.3.1 Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions

All *B. glumae* strains used are derivatives of the wild-type strain BGR1 and are listed in Table 2.1. Unless otherwise specified, the bacteria were routinely grown from frozen stocks by culturing at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) and 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. Antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline (Tc), 10 µg ml<sup>-1</sup>, gentamycin (Gm), 20 µg ml<sup>-1</sup> and triclosan 25 µg ml<sup>-1</sup>.

**Table 2.1 Bacterial strains and plasmids.**

Bacteria	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	F <sup>-</sup> , φ80dlacZΔM15, Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1985)
SM10 λpir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km<sup>r</sup> λpir</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<b><i>B. glumae</i></b>		
BGR1	Wild-type, Rif <sup>R</sup>	(Jeong <i>et al.</i> , 2003)
BGS2	<i>tofl::Ω</i> in BGR1	(Kim <i>et al.</i> , 2004)
ED2106	Deletion of <i>rhIA</i> in BGR1	This study
ED2123	BGR1::pAN2	This study
ED2124	BGS2::pAN2	This study
<b>Plasmids</b>		
pEX18Gm	Gm <sup>r</sup> , <i>oriT</i> <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup> , gene replacement vector with multiple cloning site from pUC18	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pFTC1	Tetracycline resistance cassette FRT vector, Tet <sup>R</sup>	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
pFLPe4	Curable Flp recombinase expression vector, Km <sup>R</sup>	(Choi <i>et al.</i> , 2008)
mini-CTX- <i>lux</i>	Integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i>	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pAN1	pEX18Gm with 5' and 3' fragments of <i>rhIA</i> interrupted by a Tc <sup>R</sup> cassette	
pAN2	<i>rhIA</i> promoter fused to <i>luxCDABE</i> in mini-CTX- <i>lux</i>	This study

For swarming and swimming assays, plates consisted of modified M9 medium [20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8.6 mM NaCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 11 mM dextrose; 0.5% casamino acids (Difco)], solidified with 0.5% or 0.25% Bacto-agar (Difco) respectively (Tremblay *et al.*, 2007). The method was essentially as before (Tremblay *et al.*,

2008), except that plates were allowed to dry for 30 min, and 34°C was chosen as the incubation temperature. These key parameters which affect swarming were optimized for *B. glumae* in order to maximize the reproducibility of swarm plate results. One ml of an overnight culture of each strain was adjusted to OD<sub>600</sub> 3.0, centrifuged and washed twice with phosphate-buffer saline (PBS) and suspended in 100 µl PBS. To inoculate the plates, 5 µl (swarming) or 1 µl (swimming) of bacteria suspension were spotted in the center. Five replicates were performed for every test and the experiments were performed three times, independently.

The same medium as above without agar was used for production of rhamnolipids in liquid cultures. To determine whether rhamnolipid production could be restored by exogenous addition of signal molecules, culture media were supplemented with 8 µM C8-HSL (Sigma-Aldrich). The extract of *B. glumae* rhamnolipids used for complementation of swarming was obtained as described previously (Déziel *et al.*, 1999).

#### **2.1.3.2 Mutant and reporter construction**

Plasmids utilized are listed in Table 2.1. A *rhIA*<sup>-</sup> mutant was generated by allelic replacement with a fragment of gene *bglu\_2g05650* (*rhIA*) containing a Tc<sup>R</sup> resistance cassette flanked by FLP recognition target (FRT) sites. To accomplish this, a 862 bp DNA fragment corresponding to the 5' end of *rhIA* and adjacent chromosomal sequences was amplified using primers VDrhIA2F and VDrhIA2R, and a 763 bp DNA fragment corresponding to the 3' end of *rhIA* and its adjacent sequences was amplified using VDrhIA3F and VDrhIA3R (Table 2.2). A 2014 bp Tc<sup>R</sup> resistance cassette was amplified from the pFTC1 plasmid with 50-bp overhang sequences identical to the adjacent region fragments by using primers VDrhIA1F and VDrhIA1R. In a second amplification, the three PCR products were joined together and amplified using the primer pair VDrhIA2F/VDrhIA3R. The resulting 3639 bp PCR product was T/A cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA), excised by *EcoRI* digestion and finally ligated into the corresponding site of pEX18Gm (Hoang *et al.*, 1998). This construct, pAN1, was introduced into *B. glumae* BGR1 by conjugation with donor *E. coli* SM10λpir and the recombinants were selected on LB agar with Tc (10 µg ml<sup>-1</sup>) while *E. coli* was inhibited with triclosan (25 µg ml<sup>-1</sup>). To counterselect for bacteria that had undergone a double crossover event, colonies were streaked onto LB agar supplemented with sucrose (30%) and Tc (10 µg ml<sup>-1</sup>). Gm-sensitive colonies were analyzed by PCR to verify that *rhIA* had been successfully replaced with a mutated copy of the allele. Finally, the Tc<sup>R</sup> cassette was excised by Flp-mediated recombination, using pFLPe4 (Choi *et al.*, 2008). The Flp-mediated removal of the Tc<sup>R</sup> cassette was confirmed by PCR.

**Table 2.2 PCR Primers.**

Oligonucleotides	Sequence (5'→ 3')
VDrhIA2F	CCTGGAATTTTTCCCGTTTT
VDrhIA2R	CAGGTCTGAAGCAGATGGAAT
VDrhIA3F	GCGAGCTCGACGAATACAC
VDrhIA3R	ACACCTGCACCGACACGTAG
VDrhIA1F	AGACCGTGCCTACCTCGGCGAGCGGCTCAATTCCATCTGCTT
VDrhIA1R	GCTGCCGAGCCGGCGCACGTGGCGGGGGTGGTGTATTTCGTGAGCTCC
promrhIAF	ACGTAGAATTCGGGAAAGCAGGCAGGGTAG
promrhIAR	ACGTAAAGCTTTTTTCGATAGGCATGGCGTACTC

Transcriptional fusion strains of *B. glumae* were constructed by PCR amplification of a 923-bp fragment containing the promoter region of *rhIA* from BGR1 genome using primers promrhIAF and promrhIAR (Table 2.2). The PCR product was digested with *EcoRI* and *HindIII* and ligated within the corresponding sites in mini-CTX-*lux* (Becher *et al.*, 2000). The resulting construct was integrated into BGR1 and *tofl* mutant chromosome at the *attB* site through conjugation. Successful chromosomal integration of construct in BGR1 and *tofl* mutant was verified by PCR.

### 2.1.3.3 LC/MS rhamnolipid analysis

The rhamnolipid concentration in the various bacterial cultures was determined by LC/MS (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014a). During a period of six days, 400 µl culture samples were retrieved at regular time intervals and the OD<sub>600</sub> was measured (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Then the samples were centrifuged at 16,000 × *g* for 10 min. to remove the bacteria. To 300 µl of supernatant, 300 µl acetonitrile containing 20 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) as the internal standard were added (Dubeau *et al.*, 2009). Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a C8 reverse-phase column (Kinetex, Phenomenex) using a water/acetonitrile gradient with a constant 2 mmol l<sup>-1</sup> concentration of ammonium acetate (Dubeau *et al.*, 2009). The detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode.



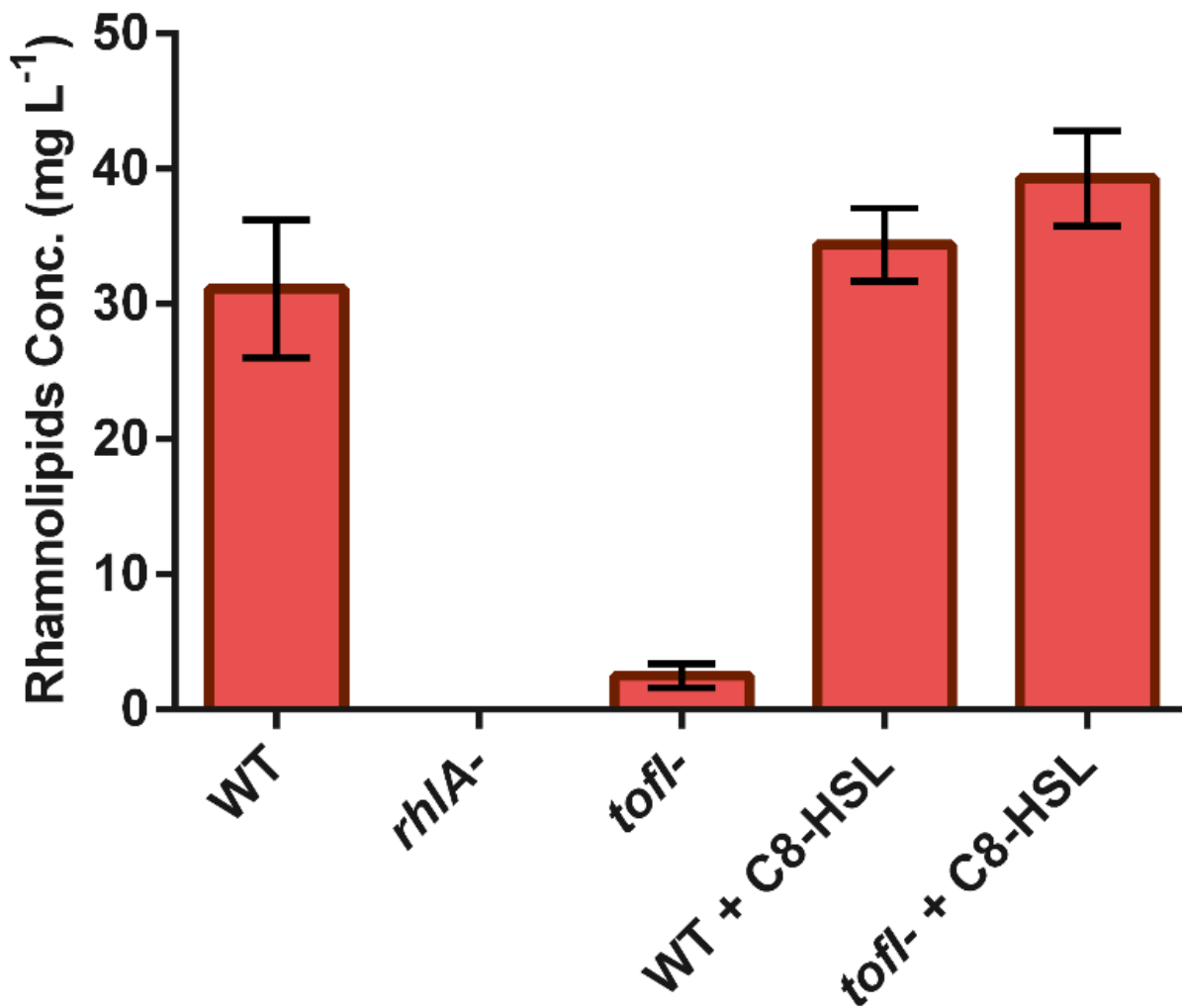
#### 2.1.3.4 Measurement of *rhIA*'-lux expression

Expression from the *rhI* operon promoter in wild-type and QS-defective *tofl* strains was quantified by measuring the luminescence of cultures of bacteria containing a transcriptional fusion of the *rhIA* promoter with the luciferase gene integrated in the genome. Cells from overnight cultures were washed twice in PBS and inoculated into 5 ml of liquid swarming medium at an initial OD<sub>600</sub> = 0.05. The cultures were grown at 34°C with shaking (240 rpm) in a roller drum. At regular time intervals 200 µl culture samples were retrieved and the OD<sub>600</sub> and luminescence (relative light units, RLU) were measured using a multimode plate reader (Cytation3, BioTek, Winooski, VT). The luminescence (*rhIA*-lux activity) corrected for culture density (RLU/OD<sub>600</sub>) was determined at the peak of *rhIA* expression after 10 h of incubation.

#### 2.1.4 Results

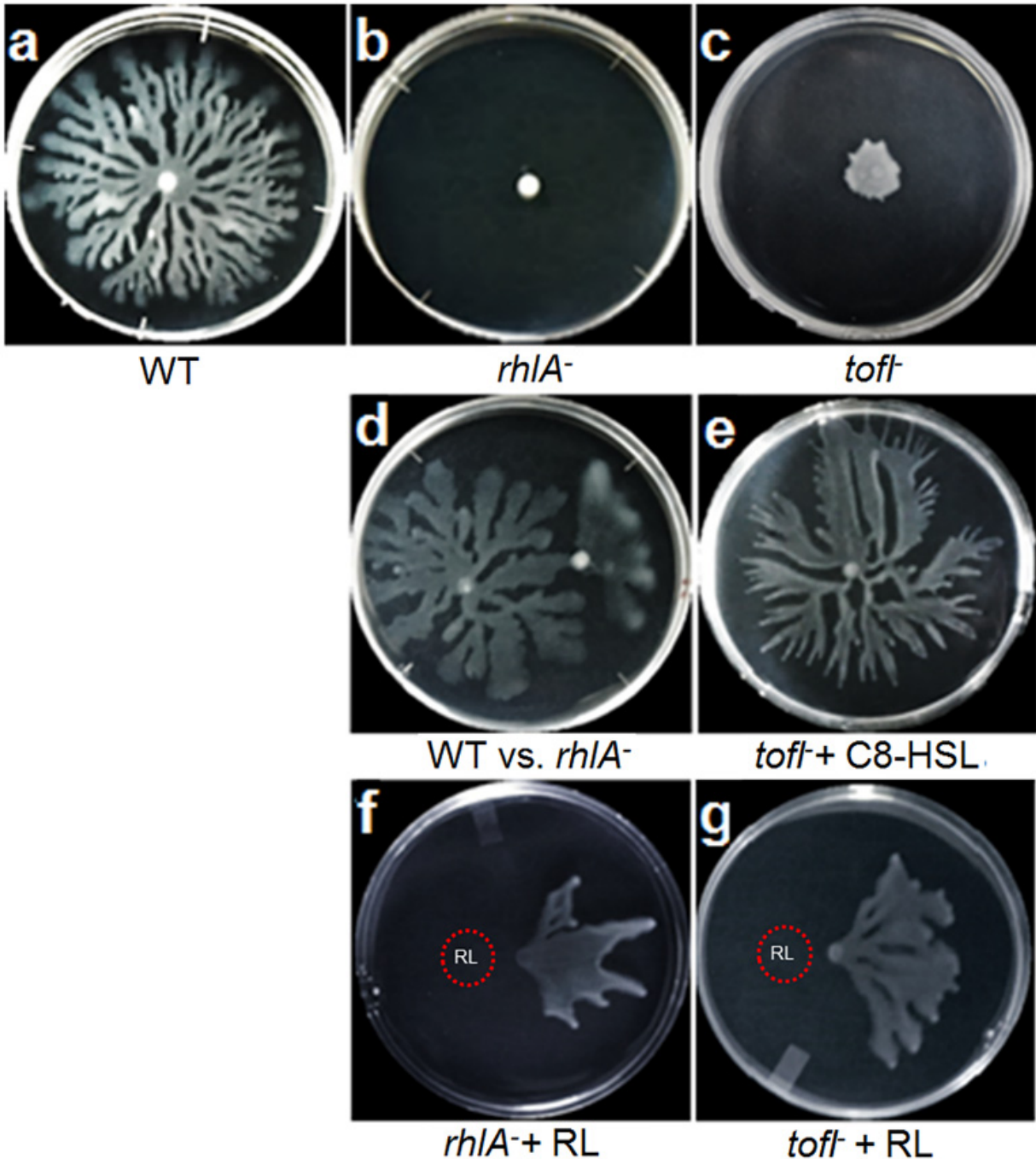
##### 2.1.4.1 Rhamnolipid production is necessary for *B. glumae* swarming motility

To verify whether rhamnolipids are involved in swarming motility of *B. glumae*, a *rhIA*<sup>-</sup> mutant was constructed in the wild-type strain BGR1 background and confirmed to have completely lost its ability to produce rhamnolipids (Figure 2.1). Investigating swarming motility showed that BGR1 exhibits a typical dendritic pattern formation, while the *rhIA*<sup>-</sup> mutant is unable to swarm (Figure 2.2 a and b). We then examined whether the *rhIA*<sup>-</sup> mutant could recover its swarming phenotype by using the rhamnolipids produced by the wild-type strain. To do so, the *rhIA*<sup>-</sup> mutant and the wild-type strain were both inoculated on the same plate separated by distance of 2 cm between the inoculation points. The results show that the *rhIA*<sup>-</sup> mutant can exploit the rhamnolipids produced by the neighbouring wild-type colony and exhibit swarming (Figure 2.2 d). Similarly, the *rhIA*<sup>-</sup> mutant could regain swarming motility when supplied with exogenous rhamnolipids: a drop of *B. glumae* rhamnolipids at 1 cm from the inoculation point of the *rhIA*<sup>-</sup> mutant was sufficient to induce swarming (Figure 2.2 f), indicating that rhamnolipids are the only factor missing for swarming of that mutant, and likely the element provided by the WT colony in Figure 2.2d.



**Figure 2.1 Rhamnolipids production of various *B. glumae* strains.**

Bacteria were grown in liquid swarming medium for 24 hours at 34°C. The mutant *rhIA-* is not capable of producing rhamnolipids. While the production of rhamnolipids by the *tofI-* mutant is almost abrogated, near wild-type production level are restored upon exogenous addition of 8 μM C8-HSL. The C8-HSL addition to wild-type does not significantly modify its rhamnolipid production. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent cultures.



**Figure 2.2 Swarming motilities of various *B. glumae* strains.**

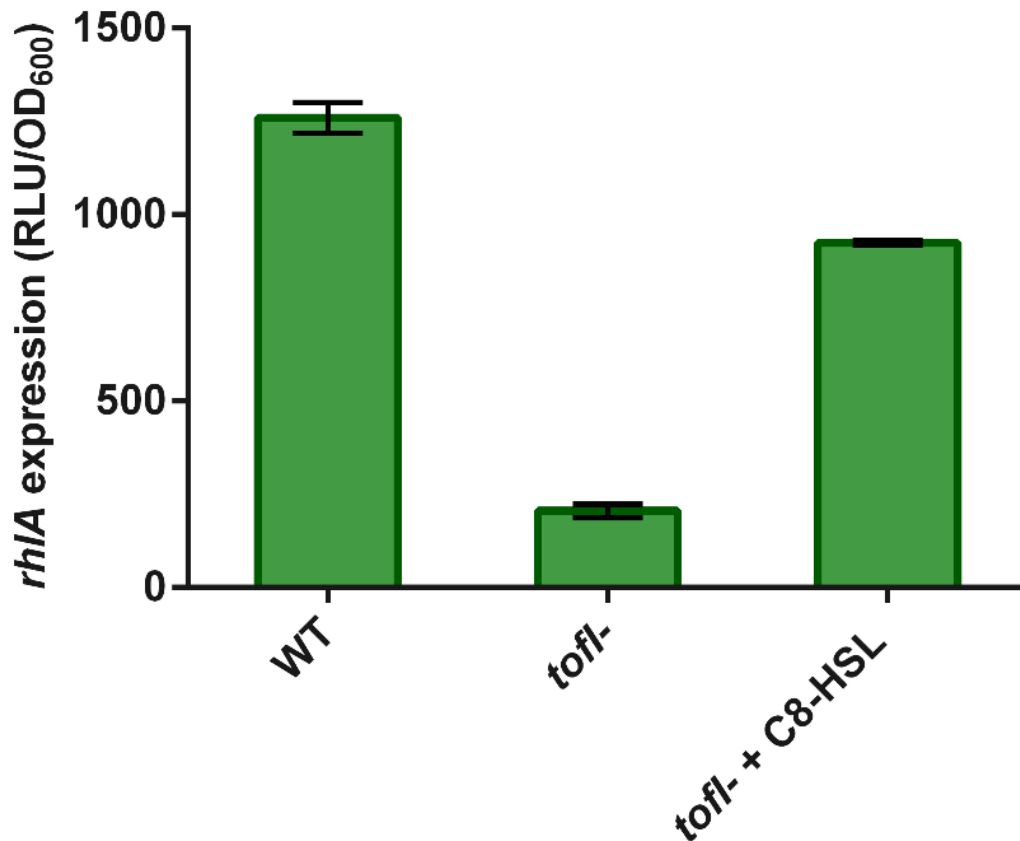
Plates were incubated for 18 hours at 34°C. (a) Wild-type strain BGR1. (b) *rhIA*<sup>-</sup> mutant which is not capable to produce rhamnolipids completely loses its swarming phenotype. (c) Swarming of quorum sensing signal negative *toff*<sup>-</sup> mutant is essentially abolished. (d) Wild-type strain (right) and *rhIA*<sup>-</sup> mutant (left) were placed on the same plate separated by a 2 cm distance between the inoculation points. The *rhIA*<sup>-</sup> mutant, which is incapable of swarming by itself, recovers its swarming phenotype by using the rhamnolipids diffusing from the wild-type strain colony. (e) Swarming motility of the *toff*<sup>-</sup> mutant is recovered by exogenous addition of 8 μM C8-HSL to the swarming medium. (f) The *rhIA*<sup>-</sup> mutant recovers its swarming following exogenous supply of rhamnolipids, applied as a 5 μl drop of a 100 mg/ml rhamnolipids methanol solution on the surface of the swarming medium prior from inoculation at a 1 cm distance. (g) The addition of rhamnolipids to the swarming medium was performed like in (f), and similarly promotes the swarming of the *toff*<sup>-</sup> mutant.

#### 2.1.4.2 Quorum sensing modulates swarming motility of *B. glumae* through regulation of rhamnolipid production

Earlier studies have demonstrated the lack of swarming motility in a QS signal-negative mutant (*toff*) of strain BGR1 at both 28°C and 37°C (Kim *et al.*, 2007). While at 37°C the *toff* mutant is aflagellated, at 28°C the flagella are present and functional, leaving unexplained the non-swarming phenotype at 28°C. Since QS-controlled wetting agents are essential for swarming motility in other bacteria, we tested QS-dependent regulation of biosurfactant biosynthesis in *B. glumae* through examining the swarming motility of the wild-type strain BGR1 and *toff* mutant.

Swarming motility of the *toff* mutant was significantly reduced (Figure 2.2c) and the normal phenotype was restored by adding C8-HSL to the plates (Figure 2.2e). To investigate whether this impaired swarming motility is due to the lack of a surface wetting agent, we examined the production of rhamnolipids by the *toff* mutant grown in liquid culture, and measured a near-complete loss of production. Furthermore, exogenous addition of C8-HSL restored the production of rhamnolipids by the *toff* mutant to wild-type level (Figure 2.1).

Using a *rhlA-lux* reporter gene fusion, we found that transcription from the *rhl* operon promoter in the *toff* mutant was only 15% of wild-type levels, and was complemented by the exogenous addition of C8-HSL (Figure 2.3), demonstrating that QS positively regulates the expression of the *rhl* operon in *B. glumae*.



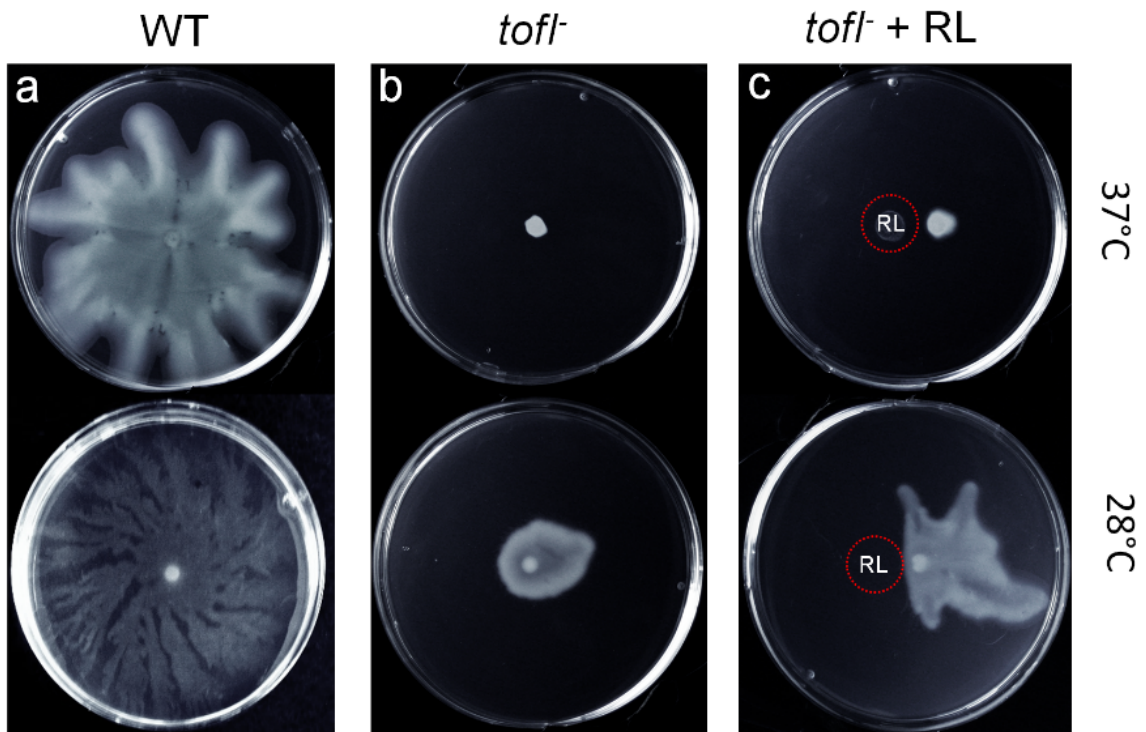
**Figure 2.3** Expression from the *rhI* operon promoter in wild-type and *tofI*- strains carrying a chromosomal *rhIA*'-*lux* transcriptional reporter.

Cultures were performed in liquid swarming medium cultures at 34°C for 10 h. The activity of *rhIA*-*lux* is significantly lower in the *tofI*- mutant than the wild-type strain and increases with the addition of 8 μM C8-HSL to the culture medium. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent experiments.

To verify whether the decreased swarming of the *tofI*- mutant is solely due to the decreased production of rhamnolipids, we tested the swarming of the *tofI*- with exogenous addition of rhamnolipids. Similar to the *rhIA*- mutant (Figure 2.2f), the *tofI*- mutant swarming defect was complemented by exogenous rhamnolipids (Figure 2.2g). Overall, these results demonstrate that rhamnolipids are positively regulated by QS in *B. glumae* and that QS directs swarming motility of *B. glumae* through rhamnolipids regulation.

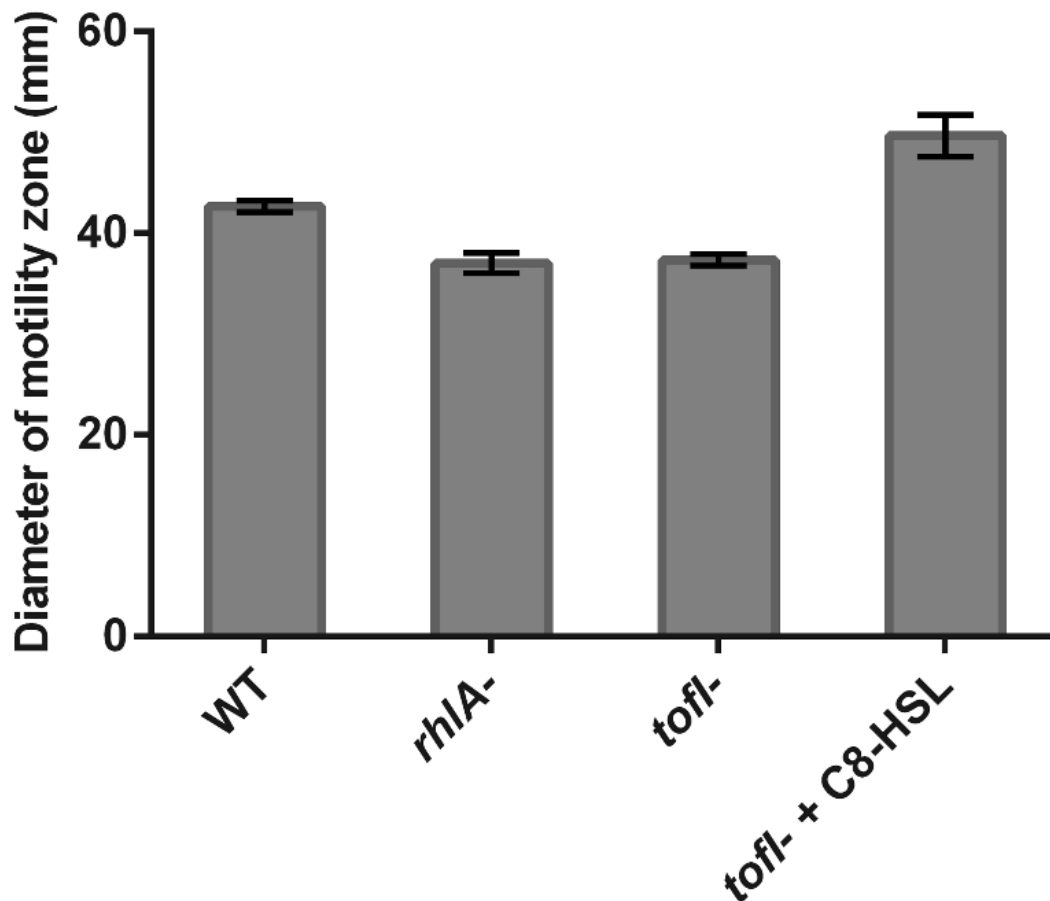
As mentioned above, in *B. glumae* QS is required for the formation of flagella at 37°C, but not at 28°C (Jang *et al.*, 2014). Since we carried out our swarming assays at 34°C, the temperature found optimal for the development of well-defined *B. glumae* migrating tendrils, there was a possibility that lack of swarming of the *tofI*- mutant was due mainly to the absence of flagella, as 34°C is closer to 37°C than to 28°C. Thus, in order to ascertain that the abrogated swarming of the *tofI*- mutant (Figure 2.2c) is solely due to lack of rhamnolipids and not to defective flagella,

we also compared the swarming of *tofl* mutant at 28°C and 37°C. In accordance with results from Kim *et al.* (2007), the *tofl* mutant was unable to swarm at 37°C, and at 28°C its swarming was essentially the same than at 34°C (Figure 2.4a and b). Accordingly, the *tofl* mutant swarming defect at 28°C was restored by exogenous rhamnolipids but not at 37°C (Figure 2.4c). Furthermore, we examined flagella-driven swimming motility of the *tofl* and *rhlA* mutants at 34°C. In line with the data shown in Figure 2.2g indicating that impaired swarming of the *tofl* mutant is merely due to the lack of rhamnolipid biosynthesis, swimming motility in the *tofl* mutant was similar to that of the wild-type strain (Figure 2.5).



**Figure 2.4 Swarming motility of *tofl* mutant at 28°C and 37°C.**

(a) Wild-type strain BGR1 exhibits swarming at both temperatures, however it has larger/less defined tendrils than at 34°C. (b) No swarming of the *tofl* mutant is observed at 37°C, and at 28°C it is nearly abolished, like at 34°C (Figure 2.2c). (c) While the *tofl* mutant recovers its swarming upon exogenous addition of rhamnolipids at 28°C, the complementation is not achieved at 37°C.



**Figure 2.5 Swimming motility of *B. glumae* strains.**

Motility capacity was measured by diameter of motility zone on swimming agar plates at 34°C. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent experiments.

### 2.1.5 Discussion

Similar to *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and *P. aeruginosa*, *B. glumae* also produces extracellular surface-active rhamnolipids. Over the last two decades, the regulation of rhamnolipids *via* QS and their role in swarming motility and as virulence factors have been extensively characterized in *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011, Dusane *et al.*, 2010, Tremblay *et al.*, 2007). However, these biosurfactants have been much less investigated in *Burkholderia* species. Previously, we have reported a role for rhamnolipids in the swarming motility of *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009). However, no study had yet addressed the function and regulation of rhamnolipids in the phytopathogen *B. glumae*.

We have confirmed that rhamnolipids are necessary for swarming of *B. glumae* by generating a rhamnolipid-negative *rhIA*<sup>-</sup> mutant in the wild-type BGR1 model strain background

and by complementing with rhamnolipids provided either by the wild-type strain or added exogenously to the medium.

Since in *P. aeruginosa* QS controls the expression of the *rhlAB* operon, responsible for rhamnolipid biosynthesis, we hypothesized that a similar regulatory system directs rhamnolipid biosynthesis in *B. glumae*. Indeed, we found that rhamnolipids are positively regulated by QS in this bacterium, adding this biosurfactant to the list of QS-dependent factors in *B. glumae*. Considering the dual regulation of polar flagellum genes and flagellar morphogenesis by QS and temperature in *B. glumae* (Jang *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2007), our finding is important to understand the mechanistic role of QS in regulation of factors contributing to swarming motility.

Previous studies have demonstrated that, while at 37°C the wild-type strain is capable of swimming and swarming motility, both of these motility phenotypes are strongly reduced in the *tofl* mutant (Kim *et al.*, 2007). On the other hand, a QS-deficient mutant of strain BGR1 grown at 28°C retains its flagella and regains swimming, but is still incapable of swarming (Kim *et al.*, 2007). We thus reasoned that a swarming motility defect at lower temperatures could be due to lack of wetting agent production. A similar phenomenon was observed for *Burkholderia cepacia* and evidence was provided that its swarming motility might be controlled through QS-dependent regulation of biosurfactant biosynthesis (Huber *et al.*, 2001). Our results of normal swimming and defective swarming of the *tofl* mutant at 34°C that can be complemented with rhamnolipids demonstrate that at a temperature where QS does not regulate flagellar morphogenesis, it controls swarming motility solely through rhamnolipid production. However, at higher temperatures such as 37°C, where flagellar biosynthesis is under control of QS, the *tofl* mutant is aflagellated and hence exhibits no swarming even if the rhamnolipids are being provided exogenously. Furthermore, with regards to the swarming of the *tofl* mutant at 28°C and 37°C, we can conclude that at 34°C the flagellar morphogenesis and swarming phenotype are similar to those at 28°C.

Many factors regulated by QS in *B. glumae* are virulence determinants (e.g. toxoflavin, flagella). Motility is important for virulence and there are many reports that non-motile strains of phytopathogenic bacteria are avirulent (Kim *et al.*, 2007, Tans-Kersten *et al.*, 2001); furthermore rhamnolipids contribute to the virulence of *P. aeruginosa* and *B. pseudomallei* (Hausler *et al.*, 2003, Zulianello *et al.*, 2006). Taken together, rhamnolipids might well contribute to the virulence of *B. glumae* through promotion of swarming motility.

It has been proposed that when environmental conditions (e.g. nutrient availability) are becoming less suitable for the bacteria, swarming motility promotes their dispersion towards



finding new niches (Tremblay *et al.*, 2010). Since rhamnolipids are costly metabolites to produce, we can envisage that in a phytopathogenic bacterium such as *B. glumae* the regulation of rhamnolipids by QS enhances the efficacy of rhamnolipids by balancing their benefits to their cost of production in situations where they contribute the most to the survival and fitness (Xavier *et al.*, 2011).

Overall, our results demonstrate that rhamnolipids production is required for swarming motility of *B. glumae*, which could reflect their hypothetical functional role in pathogenicity and survival in the host tissue. Therefore, elucidating the exact function of rhamnolipids in swarming motility and bacterial dispersal, combined with pathogenicity tests with the *rhIA*<sup>-</sup> mutant may provide insight into future strategies for controlling *B. glumae* virulence.

### **2.1.6 Acknowledgments**

Thanks to You-Hee Cho (CHA University, South Korea) for providing strains BGR1 and BGS2. Special thanks to Marie-Christine Groleau for her insightful comments and to Sylvain Milot for his technical advice. The help of Valérie Dekimpe with the construction of the *rhIA*<sup>-</sup> mutant is gratefully acknowledged. ED holds a Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

## 2.1.7 Résultats supplémentaires à l'article : « Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids »

### 2.1.7.1 Optimisation des conditions pour la préparation de géloses « *swarming* » pour *B. glumae*

Avant d'arriver au protocole final de préparation de géloses « *swarming* » décrit ci-haut (section 2.1.3.1), deux milieux nutritionnels ont été testés pour préparer des géloses « *swarming* » : (i) le milieu M9 supplémenté avec du dextrose et de la caséine hydrolysée à l'acide « Casamino acids » (M9DCAA) comme source d'acides aminés et (ii) : le milieu LB (protocole inspiré de celui décrit par Kim *et al.* (2007)). Toutes les géloses « *swarming* » étaient solidifiées avec 0,5% d'agar-Bacto (Difco) et des conditions de culture optimisées, basées sur nos connaissances concernant les conditions favorisant le « *swarming* » chez *P. aeruginosa* ont été appliquées : le temps de séchage sous la hotte à flux laminaire de 60 minutes et la température d'incubation de 30°C (Tremblay *et al.*, 2008).

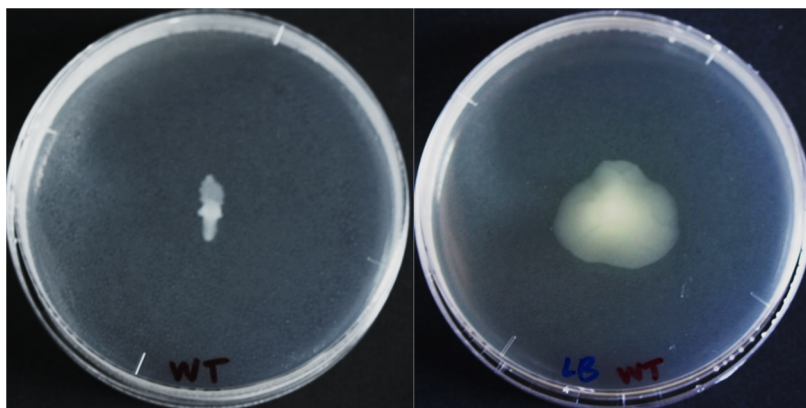


Figure 2.6 Phénotype « *swarming* » de *B. glumae* obtenu avec les milieux M9DCAA et LB.

Comme démontré dans la Figure 2.6, les protocoles utilisés n'ont pas donné un phénotype de « *swarming* » intéressant et suffisamment reproductible. Ainsi, en choisissant le milieu M9DCAA, nous avons investigué les deux facteurs qui se sont avérés importants pour le « *swarming* » : le temps de séchage sous hotte à flux laminaire et la température d'incubation (Tremblay, 2007). Donc, les géloses « *swarming* » ont été laissées à sécher sous la hotte à flux laminaire pour des périodes variables telles que 30, 45 et 60 minutes. Une fois inoculées, les géloses « *swarming* » étaient incubées aux différentes températures d'incubation : 30, 34 et 37°C.

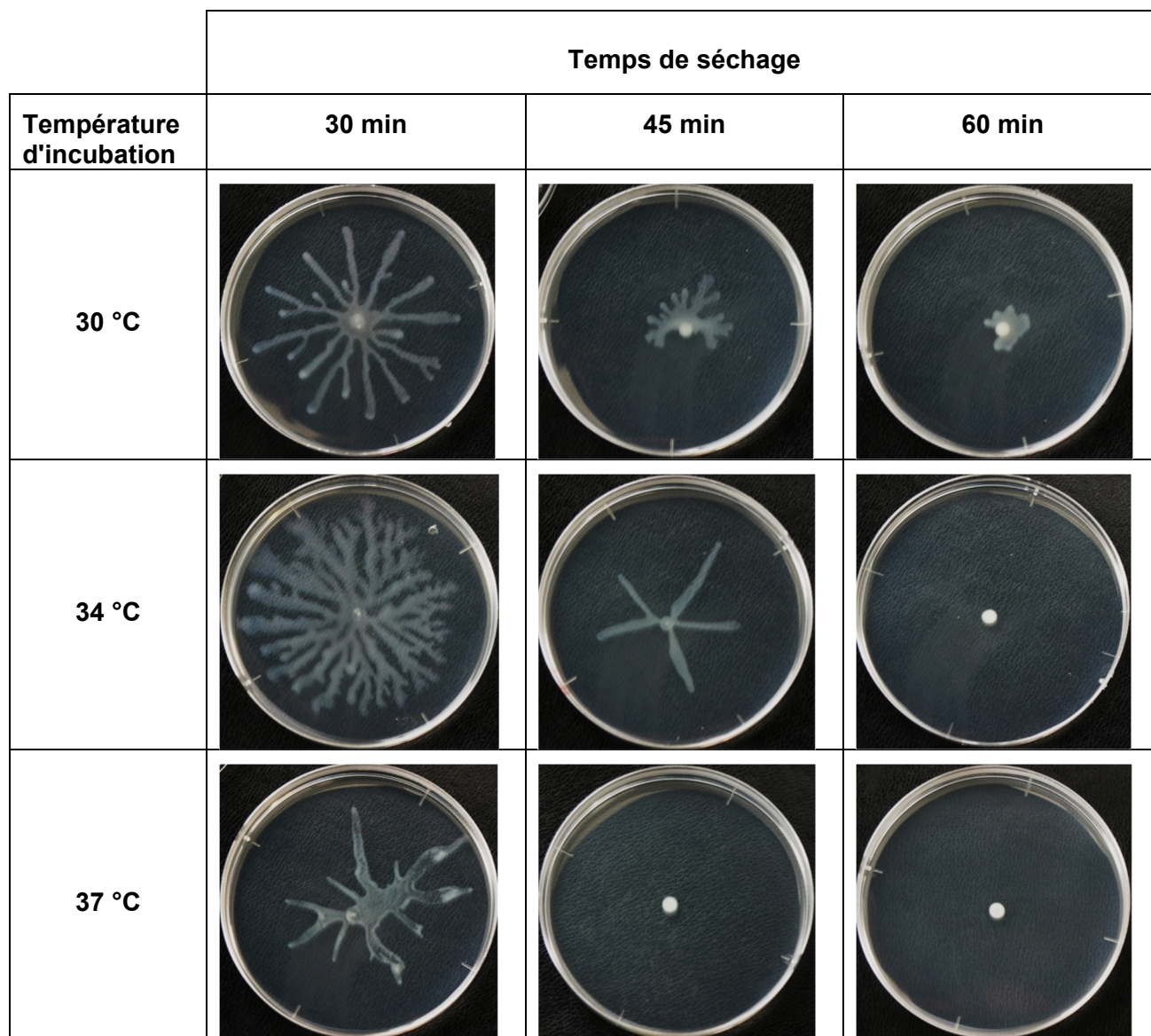


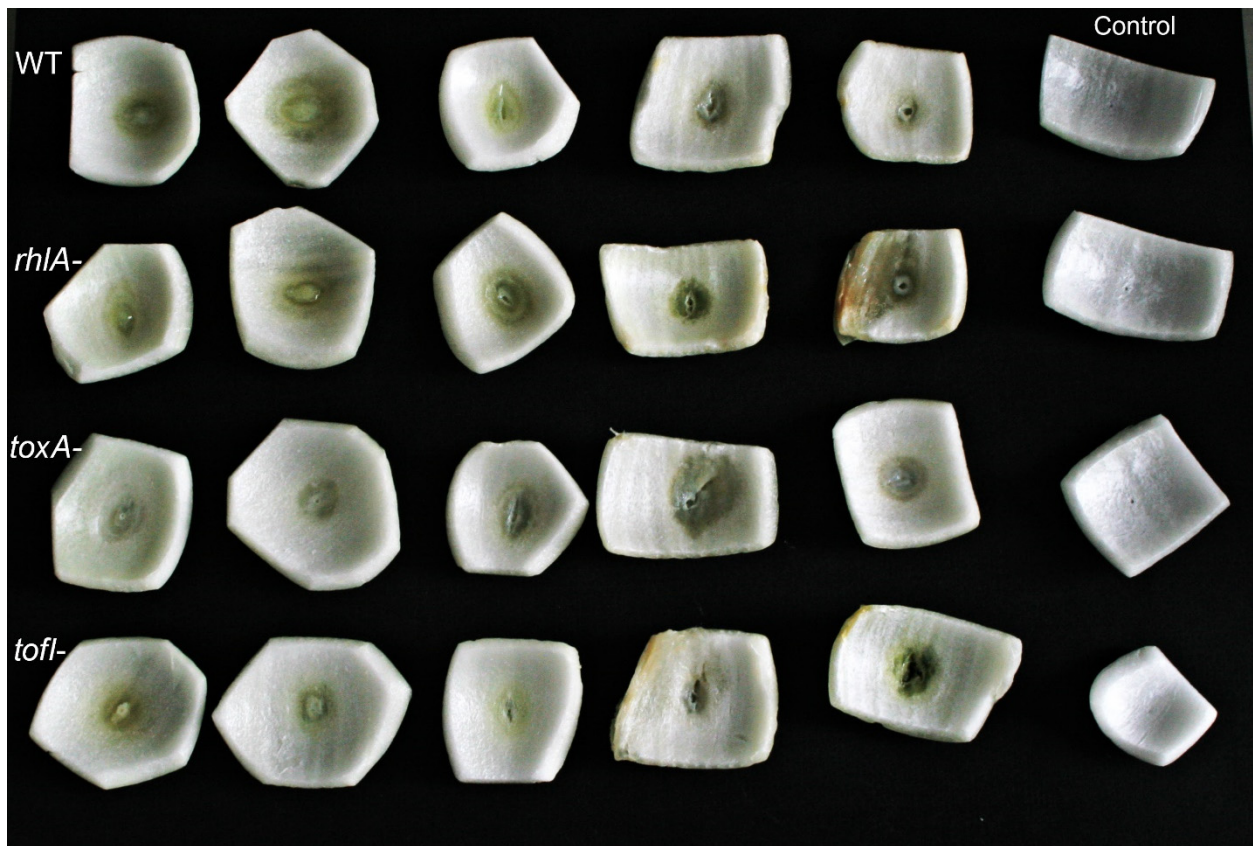
Figure 2.7 Influence de temps de séchage sous hotte à flux laminaire et la température d'incubation sur le « *swarming* » de *B. glumae*.

Selon les résultats obtenus, le temps de séchage de 30 min et la température d'incubation de 34°C ont été choisis pour étudier le « *swarming* » chez *B. glumae*.

### 2.1.7.2 Étude du rôle des rhamnolipides dans la pathogénicité de *B. glumae*

Afin de vérifier si les rhamnolipides ont un rôle dans la virulence de *B. glumae*, nous avons testé la pathogénicité des mutants de *B. glumae* envers l'oignon par rapport à la souche sauvage. Le protocole suivi été celui décrit par Karki *et al.* (2012). Brièvement, les pelures externes d'oignon

ont été enlevées et les pelures charnues internes ont été coupées en morceaux de près de 2 × 4 cm avec un scalpel stérile. Une fente de 2 mm a été faite dans le centre de la région intérieure de chaque morceau d'oignon avec une pointe de micropipette stérile. Ensuite, afin d'infecter les pelures d'oignon, deux microlitres de suspension bactérienne dans une solution de 10 mM MgCl<sub>2</sub> avec un DO<sub>600</sub> = 0,5 provenant d'un tapis bactérien cultivé sur une gélose LB, ont été appliqués sur la fente sur chaque morceau de pelure. Les pelures d'oignon inoculées ont été placées dans des boîtes de Pétri avec un papier filtre imbibé avec de l'eau stérile et incubées à 30°C pendant 72 h. Le niveau de virulence de chaque souche de *B. glumae* peut être évalué en mesurant la surface de macération sur chaque écaille d'oignon. La surface de macération a été calculé d'après le formule de calcul d'aire de surfaces de l'ellipse :  $\pi \times a \times b$  où « a » est la longueur du plus petit rayon, et « b » est la longueur du plus grand rayon.



**Figure 2.8 L'essai de pathogénicité de différentes souches de *B. glumae* envers l'oignon.**  
La photo a été prise à 72 h après l'inoculation au moment de l'évaluation des symptômes.

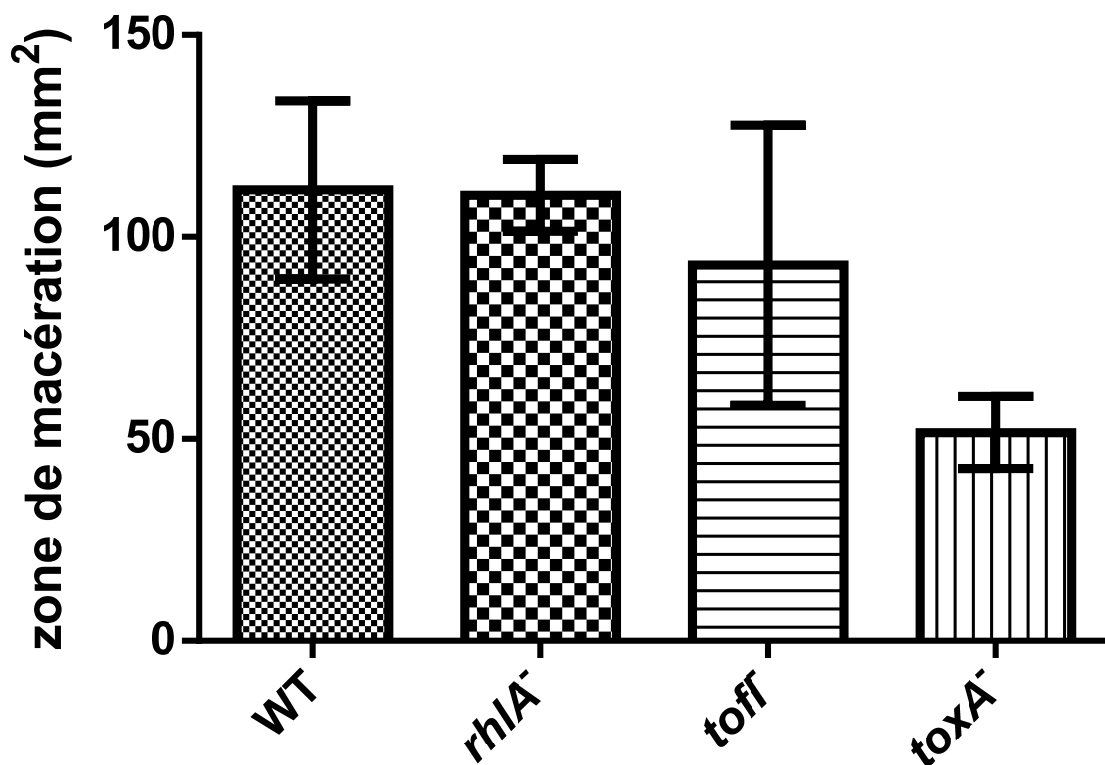


Figure 2.9 L'air de surface de la zone de macération sur les pelures d'oignons causé par les différentes souches de *B. glumae*.

Les résultats montrés dans les Figure 2.8 et Figure 2.9 sont les résultats d'une expérience parmi les 5 expériences indépendantes qui ont été effectuées. Toutefois les résultats n'ont jamais été reproductibles et nous n'avons pas pu tirer une conclusion par rapport au rôle des rhamnolipides dans la pathogénicité de *B. glumae* en comparant la zone de macération causée par la souche sauvage et le mutant *rhIA*<sup>-</sup>.

## **2.2 Adaptive Significance of Quorum Sensing-Dependent Regulation of Rhamnolipids by Integration of Growth Rate in *Burkholderia glumae*: A Trade-Off between Survival and Efficiency**

**Arvin Nickzad** and **Éric Déziel\***

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

**Journal** : Frontiers in Microbiology

**Soumission** : 28 avril, 2016

**Acceptation** : 21 juillet, 2016

**Publication** : 04 août, 2016

**DOI**: 10.3389/fmicb.2016.01215

**Citation**: Nickzad A and Déziel E (2016) Adaptive Significance of Quorum Sensing-Dependent Regulation of Rhamnolipids by Integration of Growth Rate in *Burkholderia glumae*: A Trade-Off between Survival and Efficiency. *Front. Microbiol.* 7:1215.

**Contribution** : Nickzad et Dr. Déziel ont conçu et développé les expériences. Nickzad a effectué les expériences. Nickzad et Dr. Déziel ont analysé les données. Nickzad a écrit le manuscrit et Dr. Déziel a révisé le manuscrit. Dr. Lépine et Dr. Déziel ont Fournit les réactifs, les matériaux et les outils d'analyse.



## Résumé

Le « *quorum sensing* » (QS) est un mécanisme qui permet à un groupe de bactéries de coordonner les comportements coopératifs en réponse à l'accumulation de signaux autoinducteurs dans leur environnement local. Un concept émergent est que la signification adaptative du QS dans la régulation de la production des métabolites extracellulaires coûteux (« biens publics ») pour la bactérie est de maintenir l'homéostasie de la coopération. Nous avons étudié ce modèle en utilisant la bactérie *Burkholderia glumae*, chez laquelle nous avons déjà démontré utilisant le QS afin de réguler la production de rhamnolipides, qui sont requis pour la motilité sociale nommée « *swarming* ». Nous avons constaté que le QS est superflu dans les conditions nutritionnelles riches. En revanche, la diminution des concentrations en nutriments et la réduction du taux de croissance qui en découle amplifie l'expression d'un gène impliqué dans la biosynthèse des rhamnolipides, révélant un système dont la régulation dépendante du QS est déclenchée par le taux de croissance plutôt que par la densité cellulaire. L'intégration du taux de croissance avec le QS pour la biosynthèse de métabolites coûteux, tels que les rhamnolipides, pourrait servir à évaluer la demande d'expansion de la capacité porteuse d'une population grâce à des mécanismes d'expansion spatiale, notamment le « *swarming* », favorisant ainsi les chances de survie, même si la densité cellulaire n'est pas suffisamment élevée pour une production autrement efficace de rhamnolipides. En conclusion, nous proposons que la signification adaptative de fonctionnalités dépendant du QS par le taux de croissance dans la biosynthèse des biens publics coûteux serait mécanisme de régulation permettant de favoriser le compromis optimal entre la survie et l'efficacité.

### 2.2.1 Abstract

Quorum sensing (QS) is a mechanism which enables a group of bacteria to coordinate cooperative behaviors in response to the accumulation of self-produced autoinducer signals in their local environment. An emerging framework is that the adaptive significance of QS in regulation of costly extracellular metabolites («public goods») production is to maintain the homeostasis of cooperation. We investigated this model using the phytopathogenic bacterium *Burkholderia glumae*, which we have previously demonstrated uses QS to regulate the production of rhamnolipids, extracellular surface-active glycolipids promoting the social behavior called «swarming motility». We found that QS is superfluous under rich nutritional conditions. In contrast, decreasing nutrient concentrations to reduce the growth rate amplifies rhamnolipid biosynthesis gene expression, revealing a system where QS-dependent regulation is triggered

by the growth rate of the population rather than by its cell density. Integration of growth rate with QS for biosynthesis of costly metabolites, such as rhamnolipids, could serve to assess the demand for expanding the carrying capacity of a population through spatial expansion mechanisms, such as swarming, thus promoting the chances of survival, even if the cell density might not be high enough for an otherwise efficient production of rhamnolipids. In conclusion, we propose that the adaptive significance of growth rate-dependent functionality of QS in biosynthesis of costly public goods lies within providing a regulatory mechanism for selecting the optimal trade-off between survival and efficiency.

### **2.2.2 Importance**

It has been argued that the adaptive significance of quorum sensing (QS) in regulation of cooperative behaviors is to maintain the homeostasis of cooperation where the production of costly public goods is conditioned by assessment of demand and efficiency. Previously we demonstrated that in *Burkholderia glumae*, QS positively regulates the production of surface-active rhamnolipids, extracellular metabolites promoting the social behavior called swarming motility. Now, we demonstrate that QS-dependent regulation of rhamnolipids is actually tightly coupled to the specific growth rate of the bacteria, and that there is a growth rate threshold below which QS engages in the regulation of rhamnolipids. Our demonstration provides solid mechanistic evidence for the proposed framework that the adaptive significance of QS in regulation of costly public goods is to maintain an optimized demand-driven supply of target cooperative behavior, wherein efficiency can be traded off against survival.

### **2.2.3 Introduction**

Quorum sensing (QS) is a cell density-dependent mechanism which enables a group of bacteria to synchronize the expression of behaviors in response to the accumulation of self-produced autoinducer signals in their local environment (Fuqua *et al.*, 1994). Such auto-induction regulatory systems are implicated in regulation of various cooperative phenotypes ranging from bioluminescence, virulence and nutrient acquisition to multicellular swarming motility and biofilm development (An *et al.*, 2014, Bainton *et al.*, 1992, Daniels *et al.*, 2004, Davies *et al.*, 1998, Passador *et al.*, 1993, Stevens *et al.*, 1997). These behaviors are considered cooperative because they mostly involve the production of costly extracellular metabolites («public goods») which, once produced, are available to all members of the group to share their benefits (Platt *et*



*al.*, 2009). Examples among bacteria are widespread and include production of siderophores, exoenzymes or surfactants (West *et al.*, 2006). While cooperative production of public goods enhances the fitness of the whole population, at the individual level it is prone to exploitation by non-cooperative individual cells («cheaters») that, by not producing the metabolite or QS signal, gain a competitive edge over cooperative cells and hence threaten the homeostasis of the cooperation (Diggle *et al.*, 2007, Sandoz *et al.*, 2007); this brings up questions about the evolutionary stability of cooperation.

In recent years, the adaptive functionality of QS in regulation of public goods has constituted the main subject of several studies, and has been reviewed extensively (Hense *et al.*, 2015, Schuster *et al.*, 2013). The central question relates to the benefits provided by QS in the production of public goods, and thus its role in the evolution and stability of cooperative behaviors (Schuster *et al.*, 2013). In this regard, few studies addressing the social function of QS in regulation of public goods have demonstrated that QS can offer density-dependent fitness benefits (Darch *et al.*, 2012, Goo *et al.*, 2012, Pai *et al.*, 2012). QS is used to coordinate the triggering of social behaviors at high cell densities when they are more efficient and will provide the greatest advantage to the community (Darch *et al.*, 2012). Moreover, the social function of QS in regulation of public goods is not only limited to providing fitness benefits at higher cell densities, as it can also serve as a means to anticipate stationary phase or foresee the optimum cell density of a population (Goo *et al.*, 2012). Cooperation presents a social dilemma, as cheaters should have a fitness advantage over cooperators. Still, QS can impose metabolic constraints on social cheating and protect the population from a 'tragedy of the commons' by simultaneously controlling the expression of private goods (Dandekar *et al.*, 2012). Another possible solution to stabilizing cooperation is policing, where cooperators actively penalize social cheats to hinder their success (Wang *et al.*, 2015).

While these studies offer insights on the role of QS in the evolution and stability of cooperative behaviors, the adaptive significance of QS has remained debatable. In fact, it was suggested that it is only through studying each specific auto-induction system in its evolutionary and ecological context that we can figure out its adaptive significance (Platt *et al.*, 2010). The general framework is that, while conditions specific to each ecological context, such as population cell density and spatial diffusion properties, determine whether triggering of the costly QS-regulated cooperative behaviors is beneficial to the population, the integration of QS circuitry with other global regulatory pathways such as stress responses, specific environmental and physiological cues ensures an optimized demand-driven supply of target cooperative behaviors

(Hense *et al.*, 2015). Indeed, integration of metabolic information into decision-making processes governing production of public goods, called 'metabolic prudence', can stabilize cooperative behaviors and reduce the cost of cooperation for the individual cell (Boyle *et al.*, 2015, Xavier *et al.*, 2011). Thus, the emerging picture is that in order for QS to properly regulate costly bacterial cooperative behaviors (when benefits outweigh costs of production) it must be integrated with additional physiological cues (Hense *et al.*, 2015).

Here, we demonstrate that QS-dependent regulation of a public good in the Gram-negative bacterium *Burkholderia glumae*, a pathogen of rice, is dependent on growth rate, a direct measure of the carrying capacity of a population through prevailing environmental conditions. *B. glumae* uses the LuxI/LuxR-type QS system TofR/TofI to regulate protein secretion, oxalate production and expression of various virulence determinants such as toxoflavin, lipase, KatG and flagella (Chun *et al.*, 2009, Goo *et al.*, 2010, Goo *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2007). The TofR QS transcriptional regulator is activated by its cognate *N*-octanoyl homoserine lactone (C8-HSL) autoinducer, the product of the TofI *N*-acyl-HSL synthase, to control the expression of target genes (Kim *et al.*, 2004). Similarly to what is seen in *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000, Ochsner *et al.*, 1995a), we have previously demonstrated that in *B. glumae* as well, QS positively regulates the expression of the *rhlA* gene, encoding the enzyme catalyzing the first step in biosynthesis of rhamnolipids. These extracellular surface-active glycolipids promote the social surface behavior called swarming motility (Nickzad *et al.*, 2015). Now, we show that, in contrast to *P. aeruginosa*, this QS regulation is dispensable in *B. glumae*, as rhamnolipid production is unaffected in a QS-negative mutant under unrestricted, rich nutritional conditions. This unexpected observation led us to investigate the interplay between QS and nutrition-based regulation of rhamnolipids in *B. glumae*. We found that growth rate, and not cell density itself, is the key factor triggering the QS-dependent regulation of rhamnolipid biosynthesis. Since rhamnolipids act as public goods promoting social swarming motility, integration of growth rate with QS-dependent regulation of rhamnolipids in *B. glumae* supports the concept that the adaptive significance of QS lies in providing a regulatory mechanism for trade-off between survival and efficiency.

## 2.2.4 Materials and methods

### 2.2.4.1 Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions

All *B. glumae* strains used are derivatives of the wild-type strain BGR1; the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 2.3. Unless otherwise specified, the strains were routinely regrown from frozen stocks by culturing at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) and 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on TSB agar plates. Antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline (Tc), 10 µg ml<sup>-1</sup>, gentamycin (Gm), 20 µg ml<sup>-1</sup> and triclosan 25 µg ml<sup>-1</sup>.

**Table 2.3 Bacterial strains and plasmids**

Bacteria	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	F <sup>-</sup> , φ80dlacZΔM15, Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	
SM10 λpir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km<sup>r</sup> λpir</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<b><i>B. glumae</i></b>		
BGR1	Wild-type, Rif <sup>R</sup>	(Jeong <i>et al.</i> , 2003)
BGS2	<i>tofl::Ω</i> in BGR1	(Kim <i>et al.</i> , 2004)
ED2123	BGR1::pAN2	(Nickzad <i>et al.</i> , 2015)
ED2124	BGS2::pAN2	(Nickzad <i>et al.</i> , 2015)
<b>Plasmids</b>		
mini-CTX- <i>lux</i>	Integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i>	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pAN2	<i>rhlA</i> promoter fused to <i>luxCDABE</i> in mini-CTX- <i>lux</i>	(Nickzad <i>et al.</i> , 2015)

For rhamnolipid production, complex nutrient broth (NB) medium (BD Difco, Mississauga, ON, Canada) supplemented with 4% (w/v) glycerol or mineral salts medium supplemented with 2% (w/v) glycerol and 0.1 M urea was used. The composition of the latter medium was (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub>, 0.1; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1. For NB dilution cultures, glycerol concentration was kept constant at 4% (w/v). To determine whether the rhamnolipid production could be restored by exogenous addition of signal molecules, culture media were supplemented with 8 µM C8-HSL. Cultures were grown at 34°C with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada).

#### 2.2.4.2 Growth rate measurement

The specific growth rate for wild-type and *toff* mutant in each dilution of NB medium was determined using the following equation:

$$\mu = \frac{\ln(X_{t_2}) - \ln(X_{t_1})}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

Where  $X_{t_2}$  refers to optical cell density at time  $t_2$ ,  $X_{t_1}$  is the optical cell density at time  $t_1$  and  $\mu$  represents specific growth rate.

#### 2.2.4.3 Reporter construction

Transcriptional fusion strains of *B. glumae* were constructed by PCR amplification of a 923-bp fragment containing the promoter region of *rhIA* from BGR1 genome using primers promrhIAF: 5'- ACGTAGAATTTCGGGAAAGCAGGCAGGGTAG and promrhIAR: 5'- ACGTAAAGCTTTTTTCGATAGGCATGGCGTACTC. The PCR product was digested with *EcoRI* and *HindIII* and ligated within the corresponding sites in mini-CTX-*lux* (Becher *et al.*, 2000). The resulting construct was integrated into BGR1 and *toff* mutant chromosome at the *attB* site through conjugation. Successful chromosomal integration of construct in BGR1 and *toff* mutant was confirmed by PCR.

#### 2.2.4.4 LC/MS rhamnolipid analysis

The rhamnolipid concentration in the various bacterial cultures was determined by LC/MS (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014a). During a period of six days, 400  $\mu$ l culture samples were retrieved at regular time intervals and the OD<sub>600</sub> was measured (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Then the samples were centrifuged at 16,000  $\times$  g for 10 min. to remove the bacteria. To 300  $\mu$ l of supernatant were added 300  $\mu$ l of acetonitrile and 10 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) as an internal standard (Dubeau *et al.*, 2009). Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a C8 reverse-phase column (Kinetex, Phenomenex) using a water/acetonitrile gradient with a constant 2 mmol l<sup>-1</sup> concentration of ammonium acetate (Dubeau *et al.*, 2009). The detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode.

#### **2.2.4.5 LC/MS-MS analysis for AHL production**

AHL production analysis were carried out by HPLC (Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a C8 reverse-phase column (Kinetex C8, Phenomenex), and the detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the positive electrospray ionization (ESI+) mode, supplemented by the multiple reactions monitoring (MRM) mode. Samples were prepared as described in (Chapalain *et al.*, 2013).

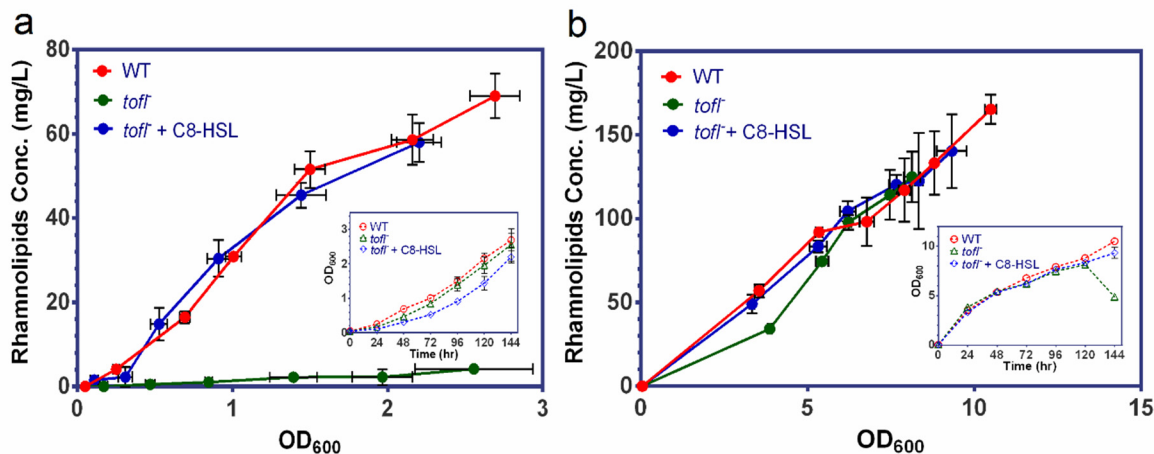
#### **2.2.4.6 Measurement of *rhIA'-lux* activity**

Expression from the *rhl* operon promoter in wild-type and QS-negative *toff* strains was quantified by measuring the luminescence of cultures of bacteria containing a transcriptional fusion of the *rhIA* promoter with the luciferase gene integrated in the genome. Cells from overnight cultures were washed twice in PBS and inoculated into test medium at an OD<sub>600</sub> of 0.05 in white clear bottom 96-well plates (Corning; 3632) containing three replicates of 200 µl per sample. The plates were incubated at 34 °C in a multimode plate reader (Cytation3, BioTek, Winooski, VT) with double orbital shaking. OD<sub>600</sub> and luminescence (relative light units, RLU) were measured every 15 minutes for a duration of 48 hr. The luminescence (*rhIA-lux* activity) was adjusted for culture density (RLU/OD<sub>600</sub>).

### **2.2.5 Results**

#### **2.2.5.1 Quorum sensing regulation of rhamnolipid production in *B. glumae* is nutritionally conditional**

To strengthen our understanding on the specific role of QS regulation in the production of rhamnolipids in *B. glumae* we studied the kinetics of rhamnolipid production in wild-type strain and *toff* mutant using a minimal medium (mineral salts medium; MSM) typically used to promote production of rhamnolipids and a complex culture media (nutrient broth; NB), both supplemented with non-limiting glycerol as carbon source (thus MSMG and NBG). As expected, the *toff* mutant that lacks the production of C8-HSL does not produce rhamnolipids in the minimal medium and this production is restored by adding C8-HSL (Figure 2.10a). On the other hand, unexpectedly, the *toff* mutant presents no defect in production of rhamnolipids in rich NB medium (Figure 2.10b).

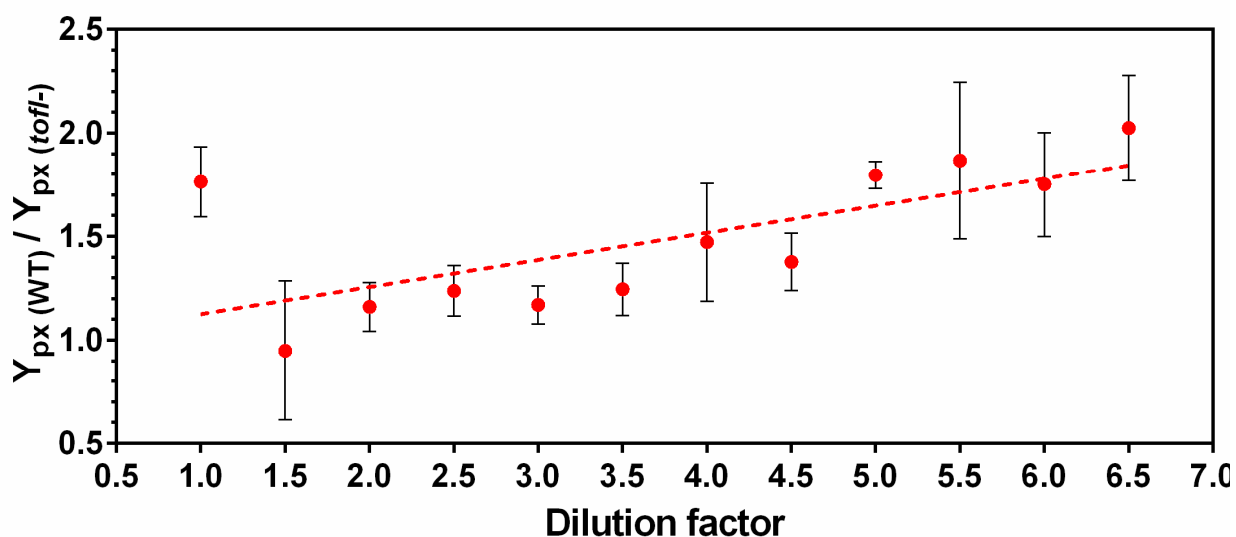


**Figure 2.10 Rhamnolipid production of *B. glumae* strains in minimal vs complex media.**

(a) While the wild-type strain produces rhamnolipids during culture in MSMG medium, the *toff* mutant is not capable of producing rhamnolipids. The wild-type production level is restored upon exogenous addition of 8  $\mu$ M C8-HSL to *toff* mutant culture medium. (b) In contrast, in NBG medium the *toff*- mutant is capable of producing rhamnolipids at wild-type levels. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent cultures. Insert graphs show the growth data plotted against time for the all the strains.

### 2.2.5.2 Quorum sensing-dependent regulation of rhamnolipids is coupled to growth rate

Since a key difference between the two culture conditions is slower growth in MSMG vs NBG (Figure 2.10), we hypothesized the impact of QS on biosynthesis of rhamnolipids is influenced by the nutritional conditions. We thus compared the rhamnolipid yield per biomass in wild-type and *toff* mutant in increasing dilutions of NB medium, while maintaining the glycerol at 4%, in order to have a decreasing gradient of nutrients. By calculating the ratio of specific production yields of the wild-type over the *toff* mutant, we found that the contribution of QS on rhamnolipid production rises linearly with increasing NB medium dilution (Figure 2.11). This shows that the regulation of rhamnolipid production relies more and more on QS upon increasing the nutrient limitation, supporting the hypothesis.

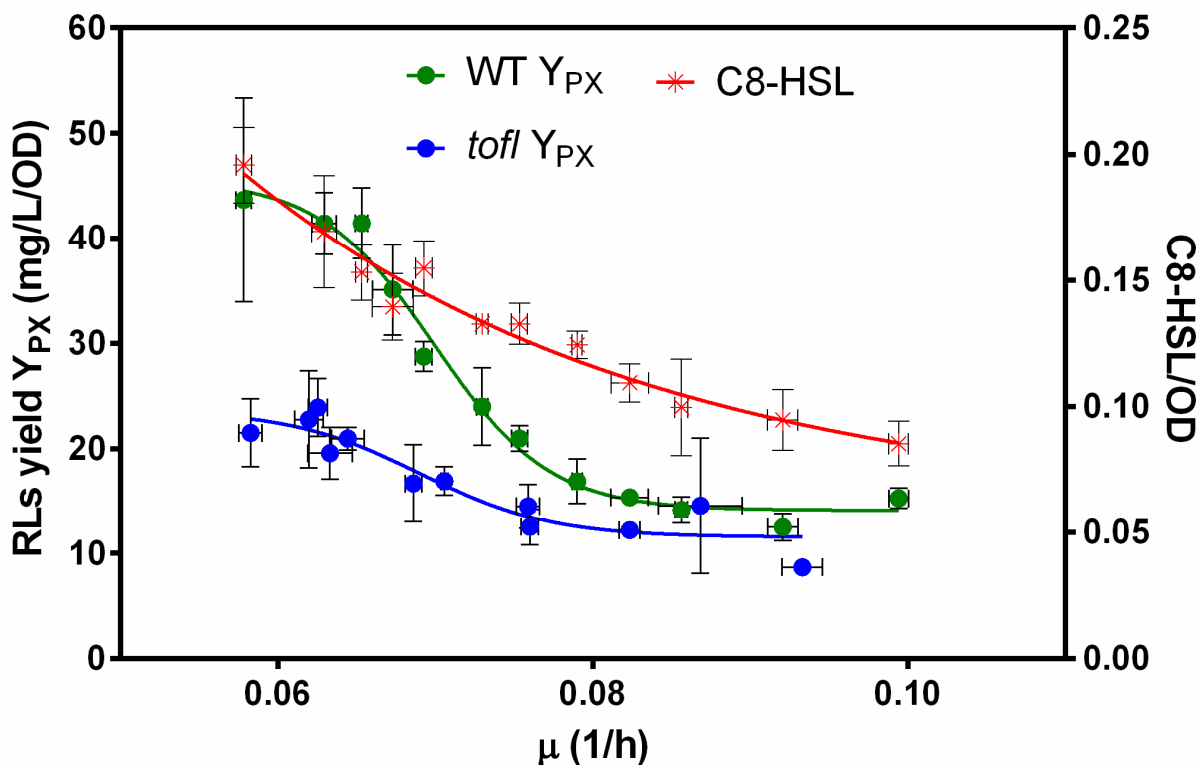


**Figure 2.11 Contribution of quorum sensing in production of rhamnolipids by *B. glumae* in different dilutions of complex NB culture medium.**

Cultures were performed in increasing dilutions of NB (glycerol maintain stable) medium for 48 h of incubation, then bacterial growth and rhamnolipids production were measured and specific production yield was calculated. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent experiments.

Diluting the concentration of available nutrients should decrease the growth rate. Thus, to investigate the effect of growth rate on the production of rhamnolipids upon increasing nutrient limitation, the specific growth rate for each NB dilution was determined (Figure 2.12). Interestingly, upon decreasing nutrient availability and consequently the specific growth rate ( $\mu$ ), the specific rhamnolipid production yields of the wild-type and *toff* mutant were not significantly different until about  $\mu = 0.08$  (1/h), mirroring the absence of contribution of QS under unrestricted growth conditions (Figure 2.10b). However, from this point on to lower  $\mu$  values, and in contrast with the QS mutant, we observed a sudden increase in rhamnolipid production yield by the wild-type strain, indicating the initiation of an activating contribution by QS as the growth rate decreases. This reveals a situation where QS-dependent regulation of rhamnolipids is triggered by the growth rate of the population rather than by its cell density.

To better understand this mechanism, we measured the yield of C8-HSLs in wild-type strain cultures and uncovered a gradual increase in signal specific concentration as the growth rate decreases (Figure 2.12). This means that the number of molecule of C8-HSL per unit of cell decreases as the growth rate augments. In addition, we saw that the wild-type C8-HSL and rhamnolipid yield curves are never parallel, which further substantiates that additional regulatory elements control the expression of QS-modulated factors such as rhamnolipids.



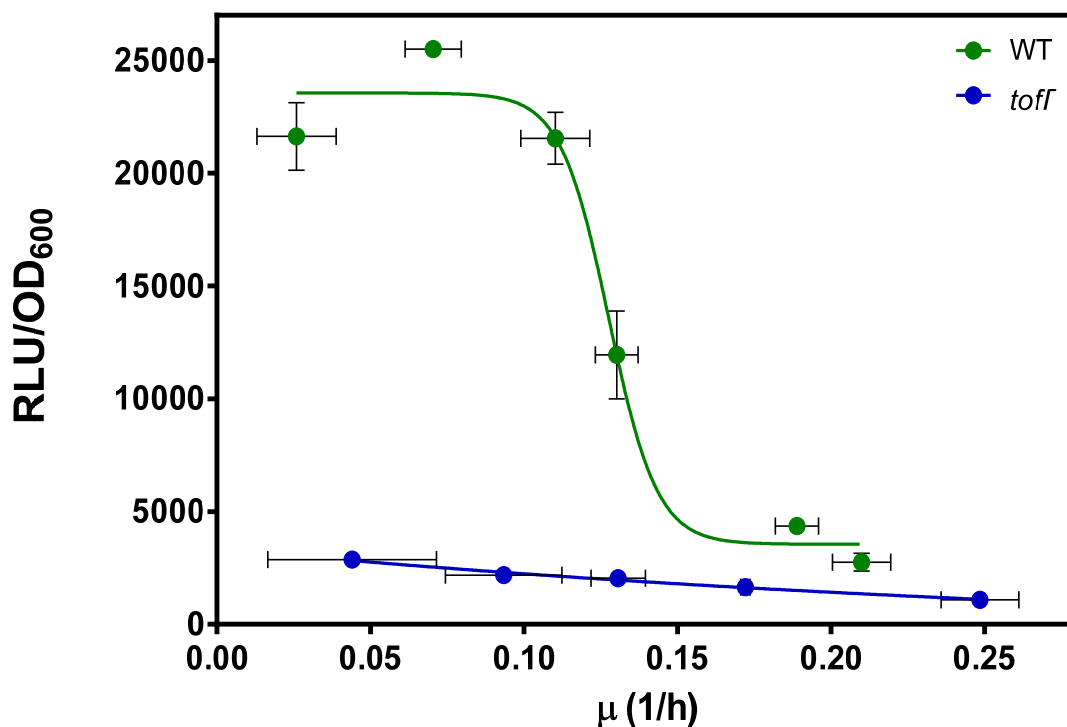
**Figure 2.12 Effect of growth rate on specific yield of rhamnolipids and C8-HSL concentration.**

After 48 h of incubation, rhamnolipids specific production yield in wild-type and *tofl* mutant and specific yield of C8-HSLs in wild-type in different dilutions of NB medium were determined for a range of specific growth rates, determined as described in Materials and methods. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent experiments.

### 2.2.5.3 Nutritional cues amplify rhamnolipid biosynthesis gene expression through QS-dependent regulation

Finally, to look more closely at the regulatory level where QS is acting, we wanted to know if nutrient-depleted conditions directly influence the expression of QS-dependent rhamnolipid biosynthesis genes. To do so, we monitored *rhIA* transcription in wild-type and *tofl* strains using a *rhIA-lux* reporter gene fusion in different dilutions of NB medium (always with the same glycerol concentration). This allowed us to investigate the direct effect of growth rate on QS-dependent regulation of *rhIA* gene. Hence, we plotted the *rhIA* expression levels in wild-type and *tofl* strains at a range of specific growth rates. As shown in Figure 2.13, as the growth rate decreases we can observe a sudden increase in *rhIA* gene expression in wild-type strain. However, the expression level of *rhIA* gene in the *tofl* mutant remains mostly unchanged. Taken together, these data suggest that induction of *rhIA* transcription by TofR occurs at a specific growth rate, instead of specific cell density or AHL concentration.





**Figure 2.13** The effect of growth rate on expression from the *rhl* operon promoter in wild-type and *toff* strains carrying a chromosomal *rhlA'-lux* transcriptional reporter

The *rhlA* promoter activity in wild-type and *toff* mutant plotted against growth rates achieved by different dilutions of NB medium. The error bars indicate the standard deviation of the mean for three independent experiments.

## 2.2.6 Discussion

We present conclusive evidence for a functional role of QS in providing an optimized demand-driven supply of target cooperative behavior, wherein QS-dependent regulation of rhamnolipids is tightly coupled to specific growth rate. Our results support the proposed model that the adaptive functionality of QS in regulation of public goods is to maintain the homeostasis of cooperation where the production of costly public goods is conditioned by assessment of demand and efficiency (Hense *et al.*, 2015).

We have previously demonstrated that in the rice pathogen *B. glumae*, QS positively regulates the biosynthesis of rhamnolipids, extracellular surface-active glycolipids which are necessary for promoting the social surface behavior called swarming motility (Nickzad *et al.*, 2015). Here, we found that a signal-negative mutant that does not produce C8-HSL maintains the ability to produce rhamnolipids in a rich nutrient broth medium, in contrast with growth in a minimal medium where rhamnolipid production is absent (Figure 2.10). This led us to hypothesize that

QS-dependent regulation of rhamnolipids in *B. glumae* is nutritionally conditional. Comparison of the yield of rhamnolipids per biomass in the wild-type and *tofl* mutant strains in a decreasing gradient of nutrients revealed that the more we dilute the growth medium the more QS regulation contributes to the production of rhamnolipids (Figure 2.11). We increasingly realize that the QS circuitry in various bacteria is highly integrated with other global regulatory pathways, stress responses and specific environmental and physiological cues (Mellbye *et al.*, 2011, Williams *et al.*, 2009). Although up-regulation or down-regulation of QS-controlled factors such as rhamnolipids biosynthesis genes *rhlAB* in *P. aeruginosa* by elements other than cell-to-cell communications such as nutritional status is well known (Deziel *et al.* 2003; Guerra-Santos *et al.* 1986), this modulation always necessitates the presence of a functional QS system. The identification of a QS-dispensable regulation of rhamnolipids in *B. glumae* adds these metabolites to the list of *B. glumae* factors whose dependence on QS is conditional (Chen *et al.*, 2012, Jang *et al.*, 2014, Kato *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2007).

The dispensability of QS-regulated virulence factors and other costly metabolites, such as rhamnolipids, upon prevailing conditions and environmental cues provides insights into how these regulatory pathways have evolved to optimize the functionality of target genes they regulate. For instance, in the case of rhamnolipids biosynthesis in *B. glumae*, we found that once unrestricted nutrient resources are available, production of rhamnolipids is carried out independently of QS regulation, obviously through still-unidentified regulatory mechanisms. However, under nutrient-limited conditions with excess carbon source, QS becomes the main regulating mechanism significantly enhancing the specific rhamnolipids yield. Under nutrient-limited conditions, which *B. glumae* presumably meets in its natural habitat such as plant tissue environment, it might be more cost-effective for rhamnolipids biosynthesis to be carried out *via* a decision-making mechanism such as QS which places more restrictive controls over nutrient utilization. Notably, QS in *B. glumae* directly controls nutrient acquisition of individual cells in crowded populations (An *et al.*, 2014).

Since growth rate is a direct function of nutrient availability, we hypothesized that growth rate is the key triggering factor that induces QS-dependent regulation of rhamnolipids. Our results indicate there is a growth rate threshold below which QS engages in the regulation of rhamnolipids (Figure 2.12). In *P. aeruginosa*, slow growth is one key condition inducing regulation of QS-controlled public good genes in a metabolic prudent manner (Mellbye *et al.*, 2014). For instance, prudent regulation of rhamnolipid production ensures that cells only invest carbon into rhamnolipids biosynthesis when growth is limited by another growth-limiting nutrient, such as

nitrogen (Xavier *et al.*, 2011). In fact, presence of excess carbon in different dilutions of NB medium in our experiments, also suggest that in *B. glumae*, QS-dependent regulation of rhamnolipids is coupled to growth rate in a metabolic prudent manner. Furthermore, a gradual increase in QS signal specific concentration upon decrease of specific growth rate suggests a reduction in activation signal threshold, which reflects an increase in cellular demand for production of QS-dependent target gene product at such low density populations. Importantly, our gene expression analyses demonstrate the direct influence of the specific growth rate on QS-dependent induction of *rhlA* expression in the wild-type background, in agreement with a previous report showing that *rhlAB* expression in *P. aeruginosa* in the presence of excess carbon is tightly coupled to the growth rate, and not just cell density (Xavier *et al.*, 2011). Therefore, the role of QS in regulation of public goods is not limited to stationary phase situations at higher cell densities, but also upon encountering restrictive environmental conditions, an early induction of QS by slowed growth rate could provide some inclusive fitness benefits for the survival of an individual cell and could act as a trade-off mechanism between survival and efficiency. Our results are also in accordance with the regulation of QS gene expression by starvation in *P. aeruginosa* in which stringent response can lower the quorum threshold *via* triggering an increased signal synthesis (Schuster *et al.*, 2013, Van Delden *et al.*, 2001).

From an ecological significance perspective, induction of QS-dependent regulation of rhamnolipids at low specific growth rates could reflect two distinct scenarios for which such integrated regulation has evolved: (i) restricted nutritional conditions with low cell density (free living bacteria exposed to nutritional stress during establishment of host infection), and (ii) exhausted nutritional environment with a high cell density (bacteria living in biofilms). In both instances, since population growth is limited by the carrying capacity of the direct environment, it is conceivable that slow growth can serve as a predictive factor of the population carrying capacity (de Vargas Roditi *et al.*, 2013). Accordingly, in *B. glumae*, QS is used for anticipation of a population reaching the carrying capacity of an habitat to avoid lethal ammonia-induced alkalization by activating oxalate production, and thus promoting survival in the stationary phase (Goo *et al.*, 2012).

An effective colonization of surface niches necessitates a balance between biofilm and motility (Van Ditmarsch *et al.*, 2013). In this regard, there is an inverse regulation of biofilm formation and swarming motility (Caiazza *et al.*, 2007). Since production of surfactants is as crucial for biofilm development as for swarming motility (Nickzad *et al.*, 2014), it seems that the induction of QS-dependent rhamnolipids biosynthesis upon reduced growth rate is a key evolved

strategy to modulate swarming motility and promote dissemination of bacterial cells to find new surface niches to colonize (Déziel *et al.*, 2003, Tremblay *et al.*, 2010). Thus, integration of slowed growth rate with QS as a decision-making mechanism for biosynthesis of costly rhamnolipids could serve to assess the demand and timing for expanding the carrying capacity of a population through spatial expansion mechanisms such as swarming motility, thus promoting the chances of survival. In conclusion, we propose that the adaptive significance of growth rate-dependent functionality of QS in rhamnolipids biosynthesis lies within providing a regulatory mechanism for selecting the optimal trade-off between survival and efficiency.

### **2.2.7 Acknowledgments**

Thanks to Professor You-Hee Cho (CHA University, South Korea) for providing strains BGR1 and BGS2. Special thanks to Marie-Christine Groleau for insightful comments and to Sylvain Milot for technical advice. We are grateful to Joao Xavier for critical review of the manuscript. AN was recipient of a Ph.D. scholarship awarded by the Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS. ED holds the Canada Research Chair in sociomicrobiology.

## 2.3 Optimization of culture conditions for rhamnolipids production by *Burkholderia glumae*

Arvin Nickzad, Claude Guertin, François Lépine and Éric Déziel\*

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

**Journal :** -----

**Soumission :** -----

**Acceptation :** -----

**Publication :** -----

**DOI :** -----

**Citation :** -----

**Contribution :** Nickzad, Dr. Déziel et Dr. Guertin ont conçu et développé les expériences. Dr. Lépine et Dr. Déziel ont fourni les réactifs, les matériaux et les outils d'analyse. Nickzad a effectué les expériences. Nickzad, Dr. Déziel et Dr. Guertin ont analysé les données. Nickzad a écrit le manuscrit.

## Résumé

*Burkholderia glumae* est une bactérie de niveau de biosécurité 1 capable de produire des rhamnolipides composés de chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés plus longues que celles des rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*. Bien que les paramètres affectant la production de rhamnolipides soient bien établis chez *P. aeruginosa*, le producteur le plus connu des rhamnolipides, on connaît peu les facteurs qui peuvent influencer leur production chez *Burkholderia glumae*. Ainsi, dans cette étude, un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux a été réalisé pour cribler les facteurs limitants qui affectent de manière significative la production de rhamnolipides chez cette espèce. L'effet de six éléments nutritifs inorganiques et deux paramètres physiques ont été étudié et le mannitol, l'urée, le  $\text{CaCl}_2$  et le potassium ont été choisis afin d'optimiser davantage les niveaux de ces facteurs en appliquant la méthodologie de surface de réponse (MSR). En utilisant les conditions optimales obtenues par MSR, une production de rhamnolipides de 1,66 g/L a été atteinte, soit 5 fois plus élevée comparée aux conditions initiales avant la MSR. Dans l'ensemble, l'utilisation des approches statistiques nous a permis d'obtenir une augmentation significative de la production de rhamnolipides par *B. glumae*, et représente une étape importante dans le développement de procédés de production à plus grande échelle.

### 2.3.1 Abstract

*Burkholderia glumae* is a biosafety level 1 bacterium capable of producing rhamnolipid biosurfactant with longer 3-hydroxy fatty acid chains moieties than those produced by the prototypal producer, the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Although the rhamnolipids production capacity and parameters affecting their production are well established for *P. aeruginosa*, little is known about their production capacity and factors that may affect their production in *B. glumae*. Hence, in order to evaluate and enhance rhamnolipids production capacity of *B. glumae*, following the selection of best carbon and nitrogen sources, a two-level fractional factorial design was performed to screen the limiting factors that significantly affect the production of rhamnolipids in this bacterial species. Effect of six inorganic nutrients and two physical parameters were studied and mannitol, urea,  $\text{CaCl}_2$  and potassium phosphate buffer were selected to further optimize the levels of these factors by applying a response surface methodology (RSM). Under the identified optimized conditions, a rhamnolipid production of 1.66 g/L was obtained, which was about 5 times higher than that of the initial non-optimized conditions. This represent a key step in the development of larger scale production processes.

### 2.3.2 Introduction

Biosurfactants are surface-active molecules which possess characteristic property of reducing surface and interfacial tensions (Neu, 1996). They are important biotechnological products which their characteristics such as low toxicity, high biodegradability and stable activity at extreme pH, salinity and temperature, make them advantageous over their synthetic counterparts in a wide range of applications in various industries (Banat *et al.*, 2010, Desai *et al.*, 1997). Among all classes of biosurfactants, glycolipidic surfactants specially rhamnolipids are the most investigated molecules (Müller *et al.*, 2012). The structural diversity and environmental compatibility of rhamnolipids make them suitable for a variety of industrial, environmental and agricultural applications, such as emulsion polymerization, wetting, foaming, phase dispersion, emulsification and de-emulsification (Desai *et al.*, 1997), or as antimicrobial, antifungal and antiviral agents (Banat *et al.*, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* is the most investigated rhamnolipid producer (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Maier *et al.*, 2000). However, the use of this bacterial species in industrial rhamnolipid production is actually not ideal, as it is a well-known human opportunistic pathogen responsible for an array of infections (Lyczak *et al.*, 2000) and the required biosafety measures can impose high costs to the production. Hence, utilization of non-pathogenic rhamnolipid producing strains to replace *P. aeruginosa* in production processes is considered as a promising strategy for reducing the production costs of these biosurfactants. In recent years, a few non-pathogenic rhamnolipid producers belonging to *Pseudomonas* species such as *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas putida* (Gunther *et al.*, 2005, Tuleva *et al.*, 2002) and few other bacteria belonging to *Burkholderia* species such as *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia plantarii* and *Burkholderia glumae* have been identified (Costa *et al.*, 2011, Dubeau *et al.*, 2009, Hörmann *et al.*, 2010).

The rhamnolipids produced by most Burkholderiaceae are typically composed of a dimer of  $\beta$ -hydroxy fatty acid, coupled to two (di-rhamnolipids) or, in a smaller proportion, to one (mono-rhamnolipids) molecules of rhamnose. The main difference between the rhamnolipids produced by *Burkholderia* spp. and *P. aeruginosa* is the length of  $\beta$ -hydroxy fatty acid chains (Dubeau *et al.*, 2009). For example, *B. glumae* AU6208 produces a mixture of mono- and di-rhamnolipid congeners with side chain lengths varying from C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> to C<sub>16</sub>-C<sub>16</sub> with C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> being predominant (Costa *et al.*, 2011). Such long chain lengths have not been reported for *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

While there is ample literature on nutritional and environmental factors promoting rhamnolipid production in *P. aeruginosa* (Müller *et al.*, 2011), there is very little information available on growth factors affecting the production of rhamnolipids in Burkholderiaceae. In this regard, optimization of nutritional and environmental factors affecting the production of rhamnolipids in non-pathogenic *Burkholderia* strains is an important step for development of a cost-effective process. In this study, *B. glumae* strain BGR1, which is not a pathogen to humans, was chosen to further enhance its rhamnolipids production capacity through culture medium optimisation. Importantly, as the *B. glumae* BGR1 genome has been sequenced (Lim *et al.*, 2009), it is found that contrary to *B. thailandensis*, it contains only one copy of the *rhl* gene cluster in which the *rhIA*, *rhIB* and *rhIC* genes responsible for the biosynthesis of rhamnolipids are located in the same operon (Costa *et al.*, 2011, Dubeau *et al.*, 2009). This, along with the fact that in *B. glumae* rhamnolipids production is under control of only one quorum sensing system (Nickzad *et al.*, 2015) make *B. glumae* an ideal candidate for its rhamnolipids production to be further enhanced by genetic engineering. Besides, since *B. glumae* has already been utilized for industrial scale production of a lipase (Knapp *et al.*, 2015), suggest that *B. glumae* BGR1 is an interesting rhamnolipids producer candidate to be further studied and improved for a more cost-effective industrial production of rhamnolipids.

Mukherjee *et al.* (2006) designated the optimization of the cultivation conditions as a crucial issue for the development of a cost-competitive process. The classical method of media optimization involves changing one-factor-at-a-time (OFAT) while holding the rest of factors at fixed levels. Being one dimensional, this laborious and time-consuming method often does not guarantee determination of optimal results as it does not consider interaction of variables. In order to overcome time and resource constraints, optimization process through statistical experimental techniques have been demonstrated to be useful in decreasing the number of required experiments and as a consequence, economize time and resource consumption. In fact, in biological processes where understanding and knowledge of associated phenomenological models are limited, response surface methodology (RSM) which integrates statistical experimental design fundamentals, regression modeling techniques, and elementary optimization methods can be used to obtain a mathematical function which connects independent factors under study and their interactions with response of the system (Montgomery, 2008). Such an empirical model can then be used to either rapidly screen independent variables or optimize the response of the process.



Indeed, statistical experimental design techniques, such as factorial designs and RSM have been successfully applied to screen and optimize critical media components and culture conditions for an enhanced production of rhamnolipids (Abalos *et al.*, 2002, Deepika *et al.*, 2016, Wei *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2014). Indeed, the nature of carbon and nitrogen sources and the concentration of phosphate (Abalos *et al.*, 2002), iron and calcium, magnesium, potassium in the medium (Guerra-Santos *et al.*, 1984, Guerra-Santos *et al.*, 1986), the operational conditions such as pH (Soares Dos Santos *et al.*, 2016) and temperature (Costa *et al.*, 2011, Wei *et al.*, 2005) have been shown to greatly influence the rhamnolipids production and yield.

Here, in order to develop an optimized culture medium for *B. glumae* BGR1, in the preliminary step of optimization, seven carbon sources and six nitrogen sources were evaluated to choose the optimal carbon and nitrogen sources for rhamnolipid production. Moreover, a fractional factorial design (FFD) was used to identify factors with a significant impact on the rhamnolipid production. Subsequently, a RSM (Montgomery, 2008) including a central composite design (CCD) was applied to determine the optimum values of the significant variables for an enhanced production of the rhamnolipids by *B. glumae* BGR1.

### **2.3.3 Materials and methods**

#### **2.3.3.1 Microorganism and inoculum preparation**

*B. glumae* strain BGR1 was used in this study. The strain was routinely regrown from frozen stock by culturing at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BD) and 240 rpm in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada). For inoculation, an overnight culture was centrifuged and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS which was then used to inoculate cultures by adjusting the optical density (OD<sub>600</sub>) to 0.05. The initial mineral salt medium (MSM) used for production of rhamnolipid by *B. glumae* contained the following (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.57; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.42; urea 6; glycerol 20; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1. Trace elements was added where noted (2 ml/L of a stock solution composed of (g/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.6, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.4, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.2, sodium citrate·2H<sub>2</sub>O 2). The pH of medium was adjusted to 7 using HCl (2 N) and NaOH. (2 N).

### **2.3.3.2 Rhamnolipids and mannitol quantification**

The rhamnolipids and mannitol concentrations in the various bacterial cultures were determined by LC/MS (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014a). Briefly, one ml culture supernatants were retrieved and biomass was removed by centrifugation at  $16,000 \times g$  for 10 min. For each sample, 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) at the final concentration of 10 mg/L was added to 500  $\mu$ l of supernatant as an internal standard (Dubeau *et al.*, 2009). Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a Phenomenex Synergi Hydro-RP column (50  $\times$  2.00 mm id, 2.5  $\mu$ m) using a water/acetonitrile gradient with a constant 2 mM/L concentration of ammonium acetate (Dubeau *et al.*, 2009). The detector was a quadrupole mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode. The concentrations of rhamnolipids were calculated by comparing the data of a standard curve prepared with known concentration of pure *B. glumae* rhamnolipids. Similarly, the concentrations of mannitol were calculated by comparing the data of a calibration curve prepared with known concentrations of mannitol and HHQ-d4 as internal standard.

### **2.3.3.3 Biomass measurement**

The dry cell weight was measured by centrifuging the whole culture medium, resuspending the pellet in 5 ml of distilled water and drying the suspension in a pre-weighed aluminum dish for 72 hours at 60°C.

### **2.3.3.4 Selection of optimal carbon and nitrogen sources**

OFAT strategy was used to screen the optimal carbon and nitrogen sources for the first step of optimization. Rhamnolipid production of BGR1 in MSM with seven carbon sources (glycerol, dextrose, fructose, sorbitol, maltose, mannitol and galactose) and six nitrogen sources (urea, ammonium nitrate, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium sulphate and ammonium chloride) were evaluated. The effects of various carbon sources were tested by using urea as the nitrogen source (Costa *et al.*, 2011). For the effect of nitrogen sources, glycerol was used as the carbon source (Costa *et al.*, 2011). Cultivation was performed for 6 days in 5 ml of the culture medium in test tubes incubated at 34°C and shaking in TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada) at 240 rpm. The experiment was repeated three times and an ordinary one-way analysis of

variance (ANOVA) was performed to evaluate the significance of each carbon or nitrogen source on the rhamnolipid production for a statistical confidence of 95%.

### 2.3.3.5 FFD

For the screening of the factors that have a statistically significant influence on rhamnolipid production by *B. glumae*, a resolution IV FFD which resolves aliases between main effects and two-factor interactions was employed. A total of 8 factors at two levels were tested for their effect on rhamnolipid production: medium components such as carbon (mannitol), nitrogen (urea), potassium phosphate (concentration of potassium phosphate buffer), calcium chloride, magnesium sulfate and trace elements and culture conditions such as agitation rate (rpm) and incubation temperature. The low and high levels of each component were set far enough from each other to identify those having a significant influence on rhamnolipids production. Table 2.4 shows the values of low and high levels of factors used in the FFD. The factors were screened with a 16 run experimental design. The cultures were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of the appropriate medium for 6 days in incubator shakers (New Brunswick Scientific). For each assembly, the production of rhamnolipids (g/L) and biomass dry weight (g/L) were measured at the 6<sup>th</sup> day of culture.

**Table 2.4 Maximum and minimum values of the variables used for the production of rhamnolipids by *B. glumae* BGR1 using FFD.**

Variables	Experimental values		
	Units	Lower	Higher
Mannitol	%	0.5	2
Urea	mol/L	0.02	0.2
Potassium phosphate buffer Conc. pH 7	mM	10	40
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	g/L	0.01	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	g/L	0.1	0.4
Trace elements	ml	absent	present
Temperature	°C	30	37
Agitation	rpm	100	250

### 2.3.3.6 RSM

Based on the FFD results, a RSM was used to develop an empirical model to predict the production of rhamnolipids and to determine the optimum level of the key significant variables to maximize the production of rhamnolipids by *B. glumae* BGR1. A  $2^4$  full factorial CCD with a total of 30 experiments was applied in which levels of four independent significant variables namely, mannitol ( $X_1$ ), urea ( $X_2$ ), potassium phosphate buffer ( $X_3$ ) and  $\text{CaCl}_2$  ( $X_4$ ) were further investigated at 5 levels (Table 2.5), including eight star points and six replicates at the center points to fit a second-order polynomial equation.

**Table 2.5 Experimental range and levels of the independent variables used in CCD**

Variables	Symbol coded	Range and levels				
		-2	-1	0	+1	+2
Mannitol (%)	$X_1$	0.5	1.375	2.25	3.125	4
Urea (M)	$X_2$	0.01	0.0575	0.105	0.1525	0.2
Potassium phosphate buffer Conc. pH 7 (mM)	$X_3$	10	32.5	55	77.5	100
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	$X_4$	0.01	0.1325	0.255	0.3775	0.5

The relationship between variables and their interaction on the response ( $y$ ) were calculated using the following second-order polynomial equation:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Where  $y$  refers to the predicted response,  $X_i$  and  $X_j$  are the coded levels of the independent variables and  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  and  $\beta_{ij}$  are regression coefficients for the intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively.

In this RSM, with the exception of the selected variables, all other conditions used for this experiment were similar. The  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at concentration of 0.1 g/L was used in all experimental runs. The experiments were conducted for 144 h at 30 °C and with an agitation of 100 rpm. The experiments were performed three times.

### 2.3.3.7 Design matrix and data analysis

The design of matrix for FFD and CCD, and the data analysis were performed using the Design-Expert 10.0.0.3 (Trial version).

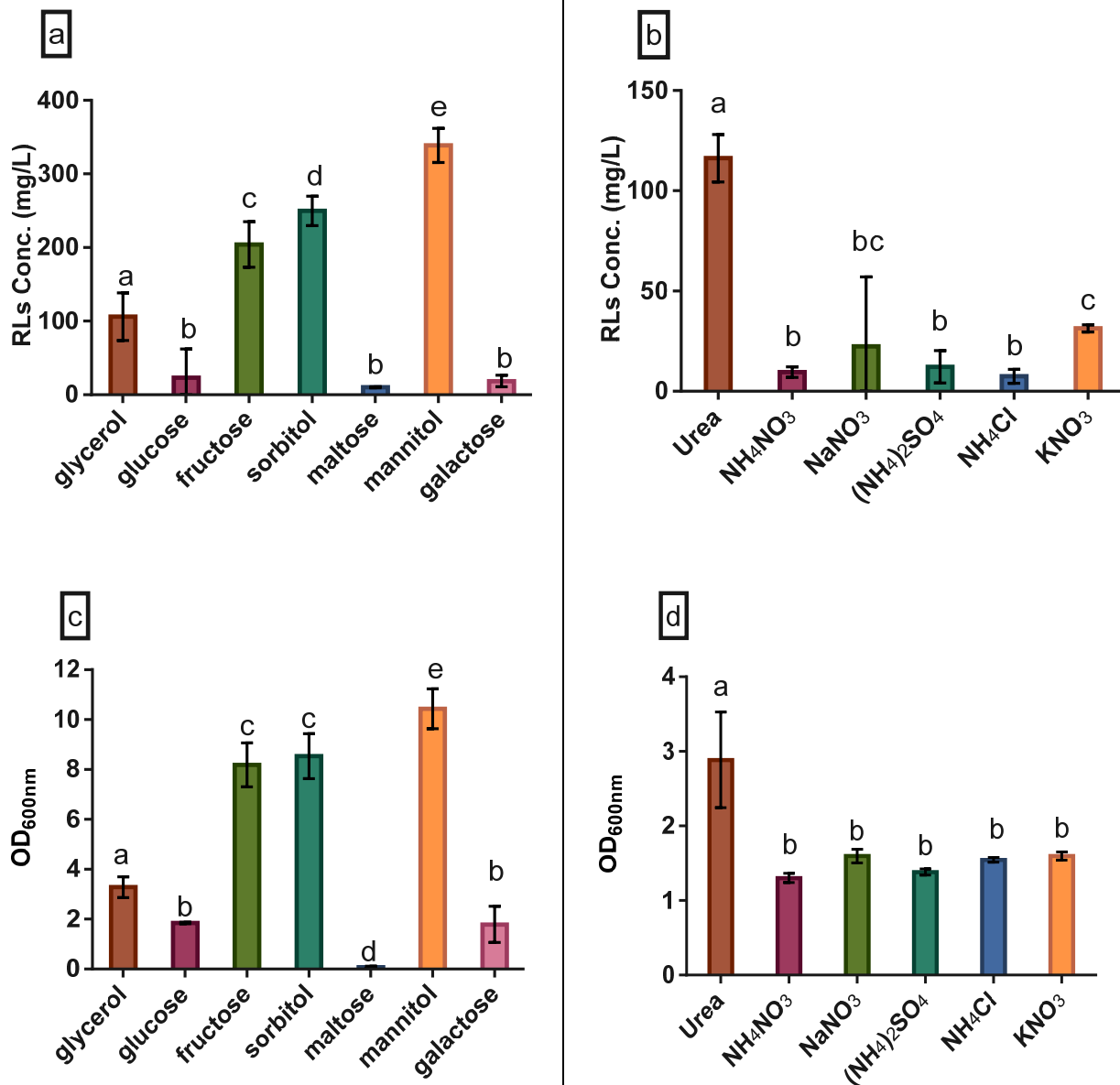
### **2.3.3.8 Optimization and model verification**

In order to find optimum values of factors which result in an enhanced rhamnolipids production, a numerical optimization was carried out to simultaneously maximize rhamnolipids production and substrate-to-product conversion yield within the studied range of experimentation. Design-Expert 10.0.0.3 trial version was used for simultaneous optimization of the multiple responses. Thereafter, a shake flask experiment was conducted to validate the predicted responses for the optimum levels of factors by the numerical optimization.

## **2.3.4 Results and discussion**

### **2.3.4.1 Selection of optimal carbon and nitrogen sources**

The results of preliminary screening of different carbon and nitrogen sources are shown in Figure 2.14. Among the seven carbon sources tested, rhamnolipid production was highest when mannitol was used a carbon source (Figure 2.14 a). Similarly, among all the screened nitrogen sources such as inorganic and ammonium salts, urea was largely the preferred nitrogen source for rhamnolipid production by *B. glumae* BGR1 (Figure 2.14 b).



**Figure 2.14 Growth and rhamnolipids production of *B. glumae* BGR1 during screening on different carbon and nitrogen sources. Production: (a) carbon (b) nitrogen, growth: (c) carbon, (d) nitrogen**  
 Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lower-case letters indicate statistically significant differences (P<0.05).

Previous study on *B. glumae* AU6208 demonstrated that a production of 555.9 mg/L can be achieved upon using urea and glycerol as nitrogen and carbon sources (Costa *et al.*, 2011). However, *B. glumae* strain BGR1 which was used in the present study produced lower amounts of rhamnolipids while had a higher growth when cultured under the same conditions. The growth results demonstrate that the main difference in rhamnolipids production observed during testing

different carbon sources is essentially correlated with differences in growth (Figure 2.14 c and d). However, similar final growth was achieved by using different nitrogen sources except urea which gave higher growth and rhamnolipids production compared to the other different nitrogen sources. Based on these results, mannitol and urea were selected as the best carbon and nitrogen sources for the further steps of optimization.

#### **2.3.4.2 Selection of significant parameters by FFD**

In order to determine the significant culture parameters affecting rhamnolipid production by *B. glumae*, a  $2^{(8-4)}$  fractional factorial design was carried out. The experimental design for 16 runs at two levels for each factor along with mean values of responses for three replicates ( $\pm$  standard deviation) are presented in Table 2.6.

**Table 2.6 Experimental design and results of the FFD**

Run	Mannitol (%)	Urea (M)	Potassium phosphate buffer Conc. (mM)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	Trace elements	Temperature (°C)	Agitation (rpm)	RLs production (mg/L) (mean ± SD)	Biomass (g/L) (mean ± SD)
1	0.5	0.02	10	0.01	0.1	-	30	100	415.9 ± 77.0	0.25 ± 0.01
2	2	0.02	10	0.01	0.1	+	37	250	ND	0.24 ± 0.11
3	0.5	0.2	10	0.01	0.4	-	37	250	201.1 ± 79.4	0.54 ± 0.03
4	2	0.2	10	0.01	0.4	+	30	100	ND	0.27 ± 0.03
5	0.5	0.02	40	0.01	0.4	+	37	100	ND	0.19 ± 0.02
6	2	0.02	40	0.01	0.4	-	30	250	736.1 ± 158.4	1.96 ± 0.12
7	0.5	0.2	40	0.01	0.1	+	30	250	ND	0.26 ± 0.04
8	2	0.2	40	0.01	0.1	-	37	100	215.4 ± 12.8	0.93 ± 0.15
9	0.5	0.02	10	0.1	0.4	+	30	250	ND	0.25 ± 0.02
10	2	0.02	10	0.1	0.4	-	37	100	359.6 ± 56.6	0.95 ± 0.13
11	0.5	0.2	10	0.1	0.1	+	37	100	ND	0.26 ± 0.04
12	2	0.2	10	0.1	0.1	-	30	250	482.27 ± 93.7	1.23 ± 0.17
13	0.5	0.02	40	0.1	0.1	-	37	250	268.53 ± 75.4	0.82 ± 0.10
14	2	0.02	40	0.1	0.1	+	30	100	972.72 ± 271.3	4.09 ± 0.12
15	0.5	0.2	40	0.1	0.4	-	30	100	444.08 ± 76.8	0.82 ± 0.06
16	2	0.2	40	0.1	0.4	+	37	250	404.32 ± 212.6	2.49 ± 1.11

Here, ND means not detected; the sign '-' is for the absence of trace elements and '+' is for presence of trace elements.



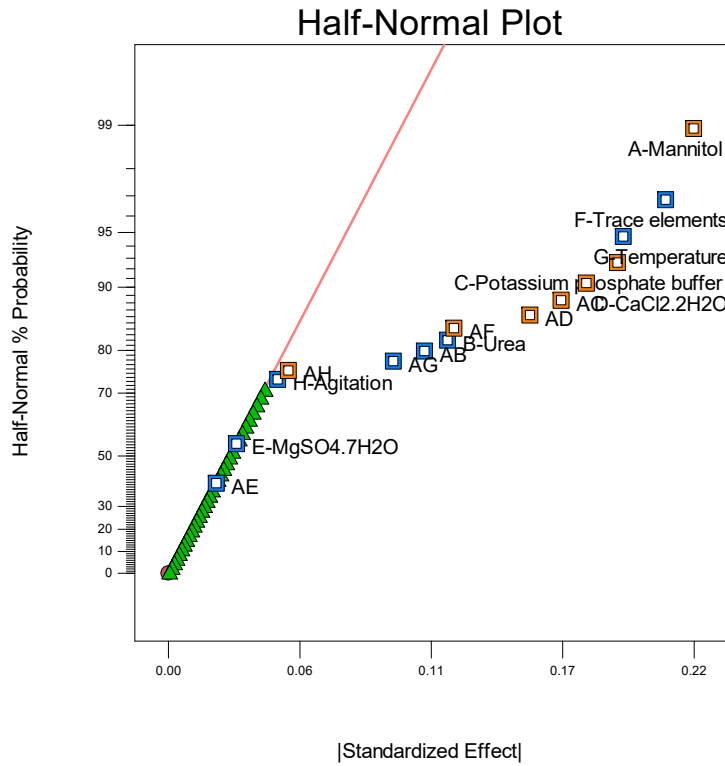
Based on these responses, preliminary regression model analysis and analysis of variance (ANOVA) were performed. In order to select the main effects which have a significant contribution to both production of rhamnolipids and biomass, a half normal probability plot was used to select factors whose confidence levels were higher than 95% (Figure 2.15). Thus, regarding rhamnolipids production, it is found that while mannitol concentration, potassium phosphate buffer and calcium chloride have the most positive significant effect on production, trace elements, temperature and urea have significant negative effects. Moreover, magnesium sulfate and agitation rate were found to be non-significant (Figure 2.15 a). Similarly, the same main factors except trace elements were also found to be significant for biomass production (Figure 2.15 b).

a

### Half-Normal Plot for Rhamnolipids

Design-Expert® Software  
Rhamnolipid

- ▲ Error estimates
- A: Mannitol
- B: Urea
- C: Potassium phosphate buffer
- D: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
- E: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- F: Trace elements
- G: Temperature
- H: Agitation
- Positive Effects
- Negative Effects



b

### Half-Normal Plot for Biomass

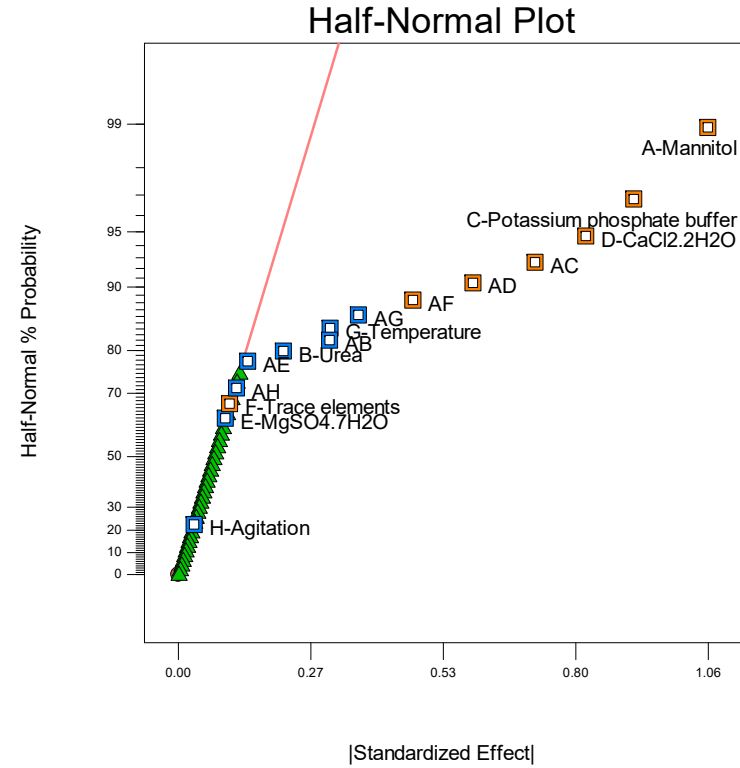


Figure 2.15 Half-Normal probability plot of main and two-factor interaction effects on (a) rhamnolipid production and (b) biomass dry weight obtained from FFD.

Accordingly, by retaining the significant factors and excluding the insignificant terms from the first-order regression models, the reduced models Eq. (2) and Eq. (3) of responses were obtained as following:

$$Y_{Rhamnolipids} = 0.28 + 0.12 A - 0.063 B + 0.099 C + 0.085 D - 0.11 F - 0.10 G - 0.058 AB + 0.087 AC + 0.073 AD + 0.057 AF - 0.051 AG \quad (2)$$

$$Y_{Biomass} = 0.97 + 0.55 A - 0.12 B + 0.47 C + 0.039 D - 0.17 G - 0.17 AB + 0.37 AC + 0.28 AD + 0.22 AF - 0.20 AG \quad (3)$$

The results of ANOVA for the reduced regression models for both responses (rhamnolipids and biomass production) is presented in Table 2.7-8.

As it can be seen from the coefficients of the first-order regression model for rhamnolipids production, addition of trace elements had a significant negative effect on rhamnolipids production. Indeed, it has long been known that by lowering the iron concentration, the metabolism of the cells can be directed from biomass formation towards rhamnolipids production (Guerra-Santos *et al.*, 1984). Similar results have been observed in *P. aeruginosa* where iron limited conditions has led to an increase in rhamnolipids biosynthesis gene expression and repletion of iron on the other hand has caused down regulation of those genes (Schmidberger *et al.*, 2014). Overall, since trace elements had a significant negative effect on rhamnolipids production and non-significant effect on biomass production, they were excluded from further analysis. Moreover, higher temperature which had a significant negative effect on both rhamnolipids and biomass production was excluded of further analysis and the lower level of temperature was selected for the further optimization steps.

**Table 2.7 ANOVA analysis for the reduced regression model of rhamnolipid production**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	3.76	11	0.34	20.16	< 0.0001
A-Mannitol	0.64	1	0.64	37.48	< 0.0001
B-Urea	0.19	1	0.19	11.18	0.0019
C-Potassium phosphate buffer	0.47	1	0.47	27.69	< 0.0001
D-CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.35	1	0.35	20.55	< 0.0001
F-Trace elements	0.57	1	0.57	33.71	< 0.0001
G-Temperature	0.48	1	0.48	28.39	< 0.0001
AB	0.16	1	0.16	9.51	0.0039
AC	0.36	1	0.36	21.40	< 0.0001
AD	0.26	1	0.26	15.18	0.0004
AF	0.16	1	0.16	9.22	0.0044
AG	0.13	1	0.13	7.46	0.0097
Residual	0.61	36	0.017		
Lack of Fit	0.071	4	0.018	1.05	0.3980
Pure Error	0.54	32	0.017		
Cor Total	4.37	47			

**Table 2.8 ANOVA analysis for the reduced regression model of biomass production**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	50.65	10	5.07	41.78	< 0.0001
A-Mannitol	14.41	1	14.41	118.82	< 0.0001
B-Urea	0.72	1	0.72	5.94	0.0197
C-Potassium phosphate buffer	10.77	1	10.77	88.82	< 0.0001
D-CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7.37	1	7.37	60.78	< 0.0001
G-Temperature	1.38	1	1.38	11.35	0.0018
AB	1.37	1	1.37	11.29	0.0018
AC	6.74	1	6.74	55.57	< 0.0001
AD	3.73	1	3.73	30.78	< 0.0001
AF	2.30	1	2.30	18.93	0.0001
AG	1.88	1	1.88	15.47	0.0004
Residual	4.49	37	0.12		
Lack of Fit	0.40	5	0.081	0.63	0.6763
Pure Error	4.08	32	0.13		
Cor Total	55.14	47			

### 2.3.4.3 CCD and fitted regression models for rhamnolipids production by *B. glumae*

Once the factors with a significant effect on rhamnolipids production were determined using a FFD, in order to find the optimum values of these variables for an enhanced production of rhamnolipids by *B. glumae*, a CCD was performed wherein rhamnolipids production, biomass and substrate-to-product conversion yield ( $Y_{P/S}$ ) were selected as response variables. The experimental data obtained from the CCD allowed the development of second-order polynomial equations where each response variable was estimated as a function of mannitol (A), urea (B), potassium phosphate (C) and CaCl<sub>2</sub> (D) along with their interaction and second-order effects

according to Eq. (1). The results obtained were then analyzed by ANOVA to assess the adequacy of fit and statistical significance of model coefficients. Probability values less than 0.05 for the model meant that selected variables and their interaction are significant and can be used to explain the variability observed in the response. Accordingly, statistically significant terms were retained and non-significant terms were dropped off from the models and then a new ANOVA was performed to obtain the reduced models. The following fitted regression reduced models (equations in terms of coded values for factors) were used to quantitatively investigate the effects of mannitol, urea, potassium phosphate buffer and CaCl<sub>2</sub> on the characterization of rhamnolipids production by *B. glumae* with regard their effect on biomass production and Y<sub>P/S</sub>:

Rhamnolipids production:

$$Y_{Rhamnolipids} = 0.6 + 0.068 A - 0.044 B + 0.28 C - 0.083 D + 0.061 AB - 0.051 BC - 0.061 CD - 0.044 C^2 + 0.059 D^2 \quad (4)$$

Biomass production:

$$Y_{Biomass} = 2.11 + 0.56 A + 1.32 C + 0.28 D + 0.19 AC + 0.12 A^2 \quad (5)$$

Substrate-to-rhamnolipids conversion yield:

$$Y_{Y_{P/S}} = 0.051 - 0.011A - 4.221 \times 10^{-3} B + 7.630 \times 10^{-3} C - 7.892 \times 10^{-3} D + 2.937 \times 10^{-3} AC + 4.043 \times 10^{-3} AD - 3.307 \times 10^{-3} BC + 3.731 \times 10^{-3} A^2 - 2.016 \times 10^{-3} B^2 - 3.443 \times 10^{-3} C^2 \quad (6)$$

The result of the variance analysis for fitting of the quadratic polynomial equation (1) to obtained data for each response are presented in Tables 2.9-11.

**Table 2.9 ANOVA for the regression model of rhamnolipids production obtained from CCD results**

Source	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	0.12	1	0.12		
Model	4.12	9	0.46	35.76	< 0.0001
A-Mannitol	0.24	1	0.24	18.56	< 0.0001
B-Urea	0.11	1	0.11	8.42	0.0052
C-Potassium phosphate buffer	3.08	1	3.08	240.57	< 0.0001
D-CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.34	1	0.34	26.47	< 0.0001
AB	0.14	1	0.14	10.62	0.0019
BC	0.098	1	0.098	7.65	0.0076
CD	0.14	1	0.14	10.67	0.0018
C <sup>2</sup>	0.081	1	0.081	6.33	0.0147
D <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	15.01	0.0003
Residual	0.74	58	0.013		
Lack of Fit	0.22	14	0.016	1.32	0.2320
Pure Error	0.52	44	0.012		
Cor Total	4.98	68			

CV% =17.60, R<sup>2</sup>= 0.8473, Adj. R<sup>2</sup>=0.8236, Pred.R<sup>2</sup>= 0.7881  
Adequate precision= 21.00 , PRESS=1.03, Std. Dev.= 0.11

**Table 2.10 ANOVA for the regression model of biomass production obtained from CCD results**

Source	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	0.010	1	0.010		
Model	79.62	5	15.92	130.96	< 0.0001
A-Mannitol	14.23	1	14.23	117.02	< 0.0001
C-Potassium phosphate buffer	61.92	1	61.92	509.29	< 0.0001
D-CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.39	1	3.39	27.92	< 0.0001
AC	1.07	1	1.07	8.81	0.0048
A <sup>2</sup>	0.79	1	0.79	6.53	0.0141
Residual	5.47	45	0.12		
Lack of Fit	2.57	17	0.15	1.46	0.1818
Pure Error	2.90	28	0.10		
Cor Total	85.10	51			

CV% =14.74, R<sup>2</sup>= 0.9357, Adj. R<sup>2</sup>=0.9286, Pred.R<sup>2</sup>= 0.9153  
Adequate precision= 33.741 , PRESS=7.20, Std. Dev.= 0.35

**Table 2.11 ANOVA for the regression model of  $Y_{P/S}$  obtained from CCD results**

Source	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	7.163E-005	1	7.163E-005		
Model	0.013	10	1.316E-003	27.01	< 0.0001
A-Mannitol	5.156E-003	1	5.156E-003	105.78	< 0.0001
B-Urea	8.171E-004	1	8.171E-004	16.76	0.0002
C-Potassium phosphate buffer	1.737E-003	1	1.737E-003	35.64	< 0.0001
D-CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.535E-003	1	2.535E-003	52.00	< 0.0001
AC	2.523E-004	1	2.523E-004	5.18	0.0280
AD	4.779E-004	1	4.779E-004	9.80	0.0031
BC	3.271E-004	1	3.271E-004	6.71	0.0130
A <sup>2</sup>	7.420E-004	1	7.420E-004	15.22	0.0003
B <sup>2</sup>	2.165E-004	1	2.165E-004	4.44	0.0409
C <sup>2</sup>	3.383E-004	1	3.383E-004	6.94	0.0117
Residual	2.096E-003	43	4.875E-005		
Lack of Fit	7.169E-004	13	5.515E-005	1.20	0.3266
Pure Error	1.379E-003	30	4.597E-005		
Cor Total	0.015	54			

CV=13.54%, R<sup>2</sup>= 0.8627, Adj. R<sup>2</sup>=0.8307, Pred.R<sup>2</sup>= 0.7773  
Adequate precision=18.661 , PRESS=3.399E-003 , Std. Dev.= 6.982E-003

The results of analysis of the ANOVA of the quadratic regression models showed that the models are significant, as is evident from the Fisher  $F$ -test with a very low probability value [ $(P_{\text{model}} > F) = 0.0001$ ]. Besides, the test for lack-of-fit which compares the variation around the model with "pure" variation within replicated observations gave non-significant lack of fit for all three models, which is desirable. The goodness-of-fit of the models were evaluated by the determination coefficient ( $R^2$ ) and adjusted coefficient of determination ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ). While the  $R^2$  coefficient is a measure of the amount of variation around the mean explained by the model, the adjusted  $R^2$  gives the proportion of the total variation in the response variable explained by the independent variables included in the model. In the present study, the adjusted  $R^2$  coefficient for rhamnolipids production, substrate-to-product conversion yield and biomass production were 0.8236, 0.8307 and 0.9286, respectively. This would imply that the experimental data show a good fit with the quadratic models and the models are significant representation of the actual relationships between the responses and regressors. For all three models the predicted  $R^2$  coefficient which indicates how well a regression model predicts responses for new observations, is also in reasonable agreement with adjusted  $R^2$  coefficient since the difference between them is less than 0.2. Moreover, the coefficient of variance (CV) for rhamnolipids production,  $Y_{P/S}$  and

biomass production were found to be (%) 17.60, 13.54 and 14.74, respectively. The CV as the ratio of the standard error of estimate to the mean value of the observed response (as a percentage) is a measure of spread that describes the amount of variability relative to the mean and it can give an estimate about the reproducibility of the model. A lower value of the coefficient of variation is desirable and can indicate a better precision and reliability of the experiments carried out. Adequate precision value which is measure of the signal to noise ratio, for all models were higher than the required value (4.00). Furthermore, the predicted residual sum of squares (PRESS), which is a measure of how a particular model fits each point in the design were found to be 1.03, 7.20 and 3.399E-003 for rhamnolipids production, biomass and  $Y_{P/S}$ , respectively. Overall, the statistics of ANOVA suggest that the models are adequate for prediction of rhamnolipids production within the range of experimental levels of medium components.

Once the fitted models are found to be adequate to predict the responses, the relative contribution of each factor to dependent variable can be measured by the respective coefficient in the fitted models. Concentration of potassium phosphate buffer was found to have the greatest coefficient in all three models and indicates the importance of the role of potassium phosphate buffer in rhamnolipids production as well as growth. Besides, the positive sign of coefficient for potassium phosphate in the fitted model for  $Y_{P/S}$  shows that the substrate-to-product conversion yield increases by increasing levels of potassium phosphate buffer. In order to understand whether potassium or phosphate content have an effect on rhamnolipids production, we compared the production of rhamnolipids in media with either potassium phosphate or sodium phosphate buffer (pH 6) at 40 mM concentration (Figure 2.16). We found that the growth and rhamnolipids production in the cultures with potassium phosphate was significantly higher compared to cultures where sodium phosphate was used as the buffer. Besides, the final pH of the cultures was also measured and compared to the initial pH to ensure that both buffers keep the pH constant. The fact that no change in final and initial pH in both cultures was observed (data not shown), suggest that it is the concentration of potassium and not the phosphate which plays an essential role in growth and rhamnolipids production in *B. glumae*.



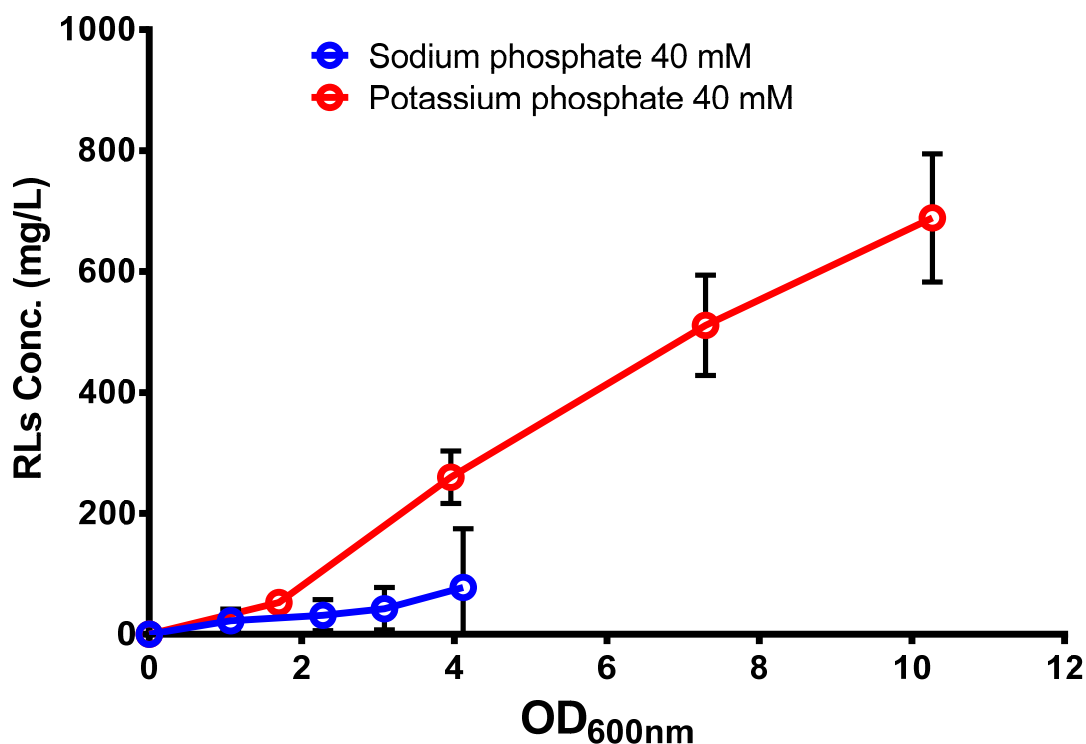


Figure 2.16 Influence of potassium on rhamnolipids production of *B. glumae*

The positive sign of coefficients for mannitol in fitted models of rhamnolipids production and biomass shows that growth and rhamnolipids production increase upon increasing mannitol. However, the negative sign of this regressor's coefficient for  $Y_{P/S}$  shows an inverse correlation between amount of mannitol and its conversion to rhamnolipids. It shows that an increased concentration of mannitol favors more growth rather than rhamnolipids production. Regarding urea, counterintuitively, we found that while it has a negative effect on rhamnolipids production and substrate-to-product conversion yield, it doesn't have any significant effect on biomass production. Moreover, a positive sign of calcium chloride coefficient in fitted model of biomass production shows that it has a positive influence on growth while it has a negative effect on rhamnolipids production and  $Y_{P/S}$ .

In order to understand the relative contribution of each factor to each dependent variable and also to interpret the interactions of factors, the three-dimensional response surface plots for three responses are presented in Fig 2.13-15. Variables with largest absolute coefficients for quadratic and interaction terms were selected for the axes of response surface plots to represent the curvature and factors interactions. Potassium phosphate buffer and calcium chloride were

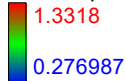
chosen for RSM plots of rhamnolipids production, while mannitol and urea concentration were kept at their central level (Figure 2.17). Accordingly, potassium phosphate buffer and mannitol were selected for RSM plots of biomass production and  $Y_{P/S}$  (Figure 2.18 and Figure 2.19).

Figure 2.17 shows that the effects of potassium phosphate buffer and calcium chloride on rhamnolipid production are not strictly linear. While calcium chloride has a negative coefficient (first order term) which translates to an increased production of rhamnolipids upon reduction of calcium chloride to its low level, its negative coefficient for interactive term with potassium phosphate suggest that it interacts in a negative manner with potassium phosphate buffer. Hence, this interaction implies that a stronger influence of potassium phosphate buffer occurs when the calcium chloride is at its lower level.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Rhamnolipid (g/L)



X1 = C: Potassium phosphate buffer

X2 = D: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

Actual Factors

A: Mannitol = 2.25

B: Urea = 0.11

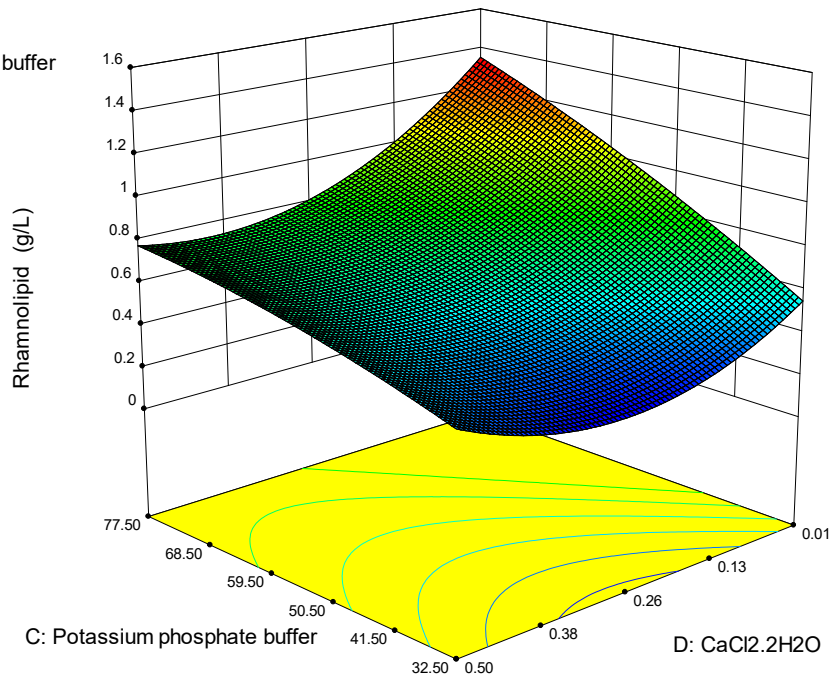


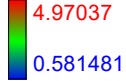
Figure 2.17 The response surface plot of rhamnolipids production as a function of potassium phosphate buffer and calcium chloride.

Figure 2.18 shows the dependency of biomass growth on potassium phosphate buffer and mannitol while the concentration of calcium chloride and urea were set at their central levels.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Biomass (g/L)



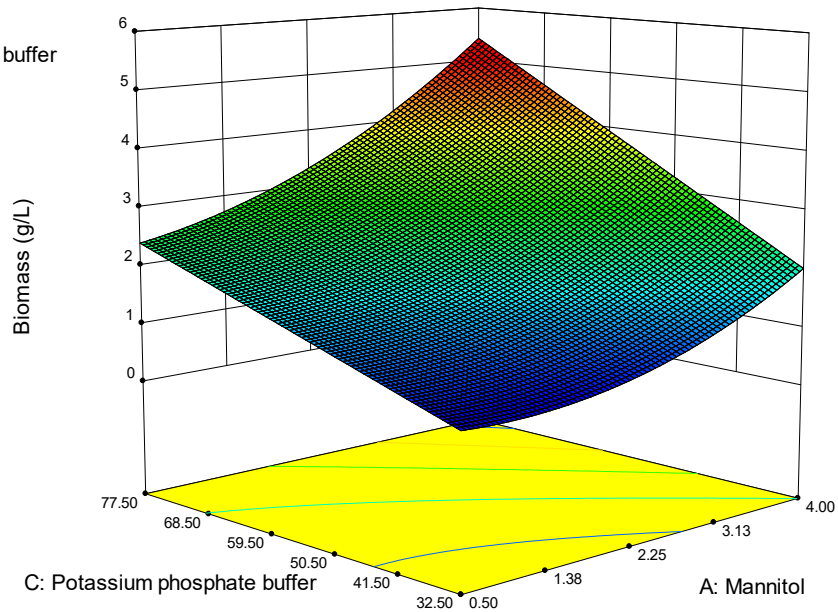
X1 = A: Mannitol

X2 = C: Potassium phosphate buffer

Actual Factors

B: Urea = 0.11

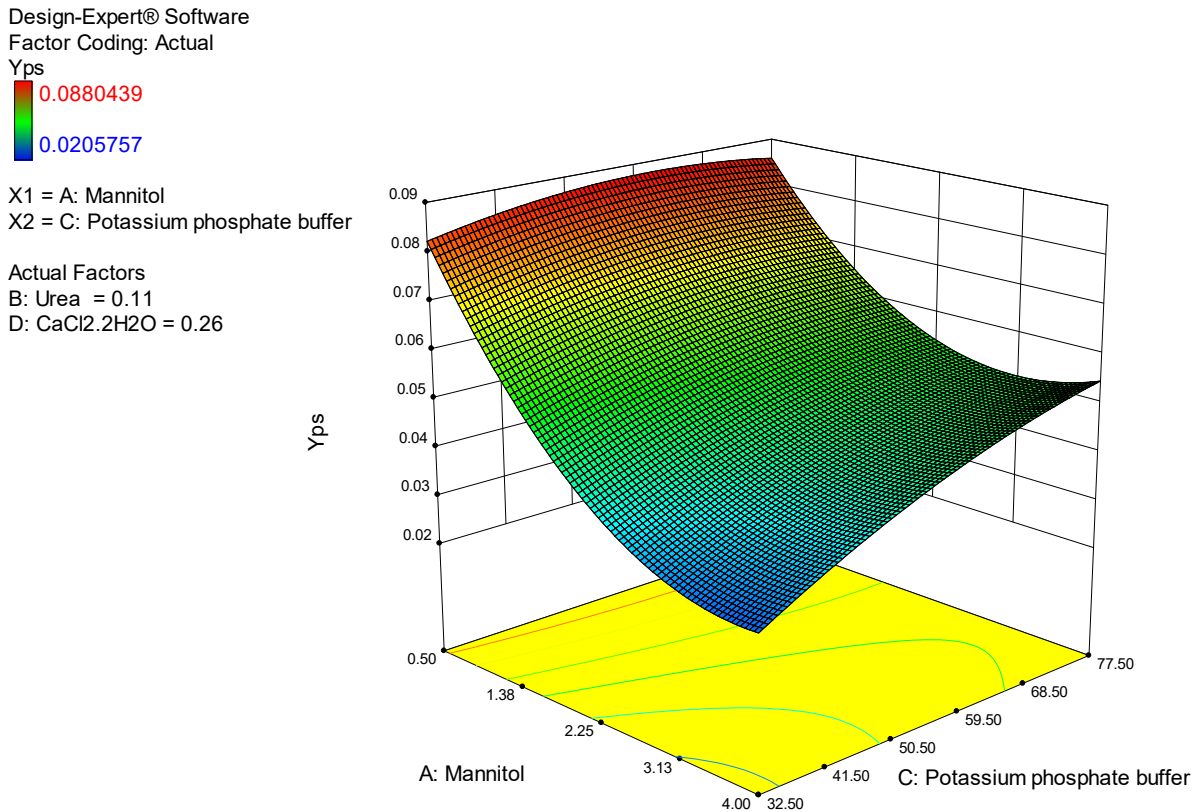
D: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O = 0.26



**Figure 2.18** The response surface plot of biomass production as a function of potassium phosphate buffer and mannitol.

As it can be seen, the positive interactive coefficient of mannitol with potassium phosphate buffer in the fitted model of biomass indicate that the effect of mannitol on biomass is more pronounced when potassium phosphate buffer is set at its higher levels.

Figure 2.19 represents the three-dimensional response surface plot for the effects of mannitol and potassium phosphate buffer on  $Y_{P/S}$ .



**Figure 2.19** The response surface plot of substrate-to-product conversion yield as a function of mannitol and potassium phosphate buffer.

As it can be seen, low levels of mannitol favors higher substrate-to-product conversion yields and in fact, this leads to more optimal substrate utilization efficiency. It's interesting to note that at this conditions the maximum biomass production (5.4 g/L) takes place at higher levels of potassium phosphate buffer (77.5 mM) and mannitol (4%) (data not shown). Furthermore, while decreasing the CaCl<sub>2</sub> levels from 0.26 g/L to 0.13 g/L has a negative effect on biomass formation, it leads to an increase in substrate-to-product conversion yield (from 0.088 to 0.1 g/g). Similarly, a reduction in urea levels leads to an increase in rhamnolipids production as well as substrate-to-product conversion yield.

#### 2.3.4.4 Optimization and model verification

Once the appropriate empirical response surface models were obtained by fitting second order polynomial equations to the experimental data, the response surfaces can be explored to find optimum operating conditions. The desirability-function approach was selected as the optimization technique and the optimum conditions were obtained by simultaneous maximization of rhamnolipids production and substrate-to-product conversion yield. Hence, the solution having the maximum desirability value was selected as the optimum culture medium composition for an enhanced production of rhamnolipids by *B. glumae*. Table 2.12 shows software generated optimum conditions of independent variables with the predicted values of responses.

**Table 2.12 Solution for simultaneous maximization of rhamnolipids production and  $Y_{P/S}$**

Mannitol (% w/v)	Urea (M)	Potassium phosphate buffer Conc. (mM)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g/L)	Desirability
0.5	0.01	100	0.01	0.107

In order to validate the optimization results predicted by the models, a shake flask experiment was carried out under optimum culture conditions (Table 2.12) and the production of rhamnolipids and biomass as well as  $Y_{P/S}$  were determined. The observed experimental values (mean of triplicates) and values predicted by the equations of the models are presented in Table 2.13.

**Table 2.13 Obtained experimental values of responses upon using optimum conditions as predicted by optimization of models**

Response	predicted value	95% PI low	Experimental value	95% PI high
Rhamnolipid (g/L)	2.02129	1.67	1.66	2.38
Biomass (g/L)	2.78316	1.96	0.85	3.61
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.122775	0.098	0.34	0.15

In spite of obtaining higher rhamnolipids production than before, the experimental findings are significantly different than the model predictions for all three responses. Interestingly, while rhamnolipid production is only about 20% lower than predicted, growth was only 30% of expected value, together resulting in a better substrate-to-product conversion yield than predicted. Measurement of the mannitol concentration at the end of culture, showed that the medium is depleted of the mannitol (data not shown). This higher substrate-to-product conversion yield

suggests that keeping mannitol at low concentrations (0.5 % W/V) and its addition to the medium by a fed-batch strategy could lead to higher substrate-to-product conversion yields.

One of the advantages of using substrate-to-product conversion yields as a response of the system is that the optimization potential of the producer strain can be estimated by comparing it to the calculated theoretical maximum yields based on ATP-balance of the *P. aeruginosa* PAO1 metabolic pathway (Müller *et al.*, 2012). Comparing the obtained optimum substrate-to-product conversion yield of 0.34 g/g<sub>RL</sub> to the maximum of 1.25 g/g<sub>RL</sub> calculated for standardized glycerolipids as substrate (Müller *et al.*, 2012), suggest that there is still space for 3.67-fold optimization which can be achieved by limiting biomass formation.

### **2.3.5 Conclusion**

This study aimed to characterize the environmental factors affecting the rhamnolipids production in batch cultures of *B. glumae*. It demonstrated the effectiveness of using design of experiments methods combined with RSM to design and optimize a better culture medium composition for an enhanced production of rhamnolipids in *B. glumae*. The results show that the capacity of rhamnolipids production by *B. glumae* was significantly enhanced by applying the RSM. A maximum rhamnolipids production of 1.66 g/L was achieved with the optimized medium which was about 5 times higher than that of the initial non-optimized conditions. The results provide a basis for further study with large scale fermentation for production of rhamnolipids with *B. glumae*.

### **2.3.6 Acknowledgments**

Special thanks to Marie-Christine Groleau for insightful comments and to Sylvain Milot for technical advice. Investigations on rhamnolipids in the ED laboratory are funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant No. 312478 and by Team grant 174316 from the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQ-NT).AN was recipient of a Ph.D. scholarship awarded by the Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS. ED holds the Canada Research Chair in sociomicrobiology.

### 3 CONCLUSION ET PERSPECTIVE

De tous les biosurfactants actuellement connus, les rhamnolipides ont le plus grand potentiel pour devenir la prochaine génération de biosurfactants introduite sur le marché. Cependant, la mise sur le marché des rhamnolipides est freinée par l'insuffisance de la productivité et leurs coûts de production élevés. Bien que les voies métaboliques et la régulation génétique de la biosynthèse des rhamnolipides soient maintenant relativement bien connues chez la bactérie *P. aeruginosa*, le transfert efficace de ces connaissances pour la production à l'échelle industrielle est toujours manquant. En outre, des niveaux élevés de production ont été décrits particulièrement avec l'huile végétale en tant que source de carbone, un choix imposant des défis importants lors de la purification des rhamnolipides, et cela pour des souches de *P. aeruginosa*, un pathogène opportuniste. L'alternative, la productivité compétitive par des hôtes hétérologues ou souches productrices naturelles non-pathogènes reste encore hors de portée.

Ainsi, l'objectif de ce projet de thèse était d'étudier et de caractériser la production des rhamnolipides chez la bactérie non-pathogène pour l'humain *B. glumae*, comme alternative plus favorable à *P. aeruginosa*. Cela a nécessité d'acquérir une compréhension de la régulation de la production des rhamnolipides chez *B. glumae* autant aux niveaux génétique que du bioprocédé.

Au niveau de régulation, considérant qu'autant la pathogénicité chez *B. glumae* que la synthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* sont régulées *via* le QS, mon hypothèse principale était que la communication intercellulaire constitue le mécanisme de régulation contrôlant la biosynthèse des rhamnolipides chez *B. glumae*. Par ailleurs, la fonction spécifique des rhamnolipides chez *B. glumae* était également inconnue. Ainsi, une partie importante de cette thèse a consisté à étudier et à déterminer le rôle des rhamnolipides et, en particulier, l'implication potentielle de ces biomolécules dans la motilité de type « *swarming* » chez cette espèce bactérienne.

Donc, le premier objectif a été de mieux comprendre la régulation des rhamnolipides et leur rôle dans la motilité du type « *swarming* ». Pour ce faire, le mutant *rhIA*<sup>-</sup> qui est incapable de produire des rhamnolipides a été construit. Ensuite, la motilité du type « *swarming* » de la souche sauvage a été comparée avec celles de mutant *rhIA*<sup>-</sup> et de mutant QS (*tofl*<sup>-</sup>). De plus, l'implication d'un système de QS dans la production de rhamnolipides a été examinée au niveau de transcription de l'opéron *rhl* chez le mutant *tofl*<sup>-</sup>, comparativement à la souche sauvage. Pour ce faire, le rapporteur transcriptionnel de type fusion-*lux* a été élaboré et transféré chez la souche

sauvage et le mutant *tofl*. Les résultats de notre article « Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids » ont permis de mettre en évidence que non seulement le QS régule la production des rhamnolipides, mais également module la motilité du type « *swarming* » au travers de la régulation des rhamnolipides.

Étant donné que, d'après Kim *et al.* (2007), les flagelles polaires jouent un rôle dans au moins deux types de motilité bactérienne chez *B. glumae*, les motilités de type « *swimming* » et de type « *swarming* », et que tous les mutants de *B. glumae* défectueux dans la biogénèse flagellaire montrent des phénotypes non mobiles et sont pratiquement avirulents, la question reste de savoir quel est le rôle des rhamnolipides dans la pathogénicité de *B. glumae* compte tenu que les rhamnolipides sont nécessaires à la motilité de type « *swarming* ». Ainsi, la caractérisation approfondie du rôle des rhamnolipides dans la pathogénicité du *B. glumae* pourrait permettre le développement des nouvelles stratégies pour le contrôle de la maladie de riz. Des essais de pathogénicité comparant le mutant *rhIA*<sup>-</sup> et la souche sauvage nous permettra de voir si les rhamnolipides jouent un rôle dans la virulence de *B. glumae*. Ainsi, les stratégies anti-virulence pourraient employer des agents de biocontrôle qui interfèrent avec le QS et donc la régulation des facteurs de virulence.

La découverte de la régulation des rhamnolipides par le système de QS chez *B. glumae* quoiqu'intéressante, n'était pas si surprenante car la synthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, et biosurfactants chez plusieurs autres espèces bactériennes, est aussi régulée par le QS. Toutefois, lors de la cinétique de la production des souches *B. glumae* dans les milieux minimal et riche (sans restriction nutritionnelle), nous avons constaté que le mutant QS (*tofl*) qui n'est pas capable de produire des rhamnolipides dans le milieu minimal, récupère sa capacité de les produire lorsqu'il est cultivé en milieu riche, une observation inattendue et inédite.

Notre article rapporté à la section 2.2 et publié au journal *Frontiers in Microbiology* a permis de démystifier cette régulation facultative des rhamnolipides par le QS, qui dépend des conditions nutritionnelles. Nous avons montré que le niveau de contrôle de la production des rhamnolipides par le QS chez *B. glumae* est en corrélation avec le taux de croissance et qu'il y a un seuil de taux de croissance en dessous duquel le QS active la régulation de rhamnolipides. Contrairement au dogme largement accepté, nos résultats révèlent un système où la régulation d'un métabolite dépendant du QS, dans une population bactérienne, est déclenchée par la réduction du taux de la croissance de la population plutôt que par sa densité cellulaire réelle. De plus, dans cet article, nous avons abordé la question centrale des bénéfices offerts par le QS pour la régulation de la production de métabolites intracellulaires coûteux à produire pour la



bactérie (« biens publics »), et donc de rôle dans l'évolution et la stabilité des comportements coopératifs. En fait, au cours des dernières années, la signification adaptative du QS dans la régulation des biens publics a constitué le sujet principal de plusieurs études. Il a été argumenté que la signification adaptative du QS dans la régulation des comportements coopératifs est de maintenir l'homéostasie de la coopération là où la production de biens publics coûteux est conditionnée par l'évaluation de la demande et de l'efficacité. Notre démonstration fournit des preuves mécanistiques solides que la signification adaptative du QS dans la régulation des biens publics coûteux est de maintenir une offre axée sur la demande optimisée du comportement coopératif cible, où l'efficacité de la production peut être compromise par l'augmentation de la chance de survie. En effet, en condition « *swarming* », la croissance et le succès des populations bactériennes dépendent de la production des rhamnolipides et ceci constitue un avantage pour la population locale de cellules. Sachant que la production des rhamnolipides est potentiellement vulnérable à l'exploitation par des « tricheurs » qui permettent d'éviter le coût de leur production, tout en bénéficiant de ces facteurs produits par d'autres, il serait intéressant d'étudier la signification adaptative du QS dans la stabilisation de la coopération par la régulation des rhamnolipides en condition « *swarming* ». Des essais « *swarming* » en comparant la co-culture de la souche sauvage (coopérative) avec des mutants *rhIA*<sup>-</sup> ou/et *tofl* (tricheurs) marquées avec des différentes protéines fluorescentes nous permettra de voir comment la régulation des rhamnolipides par QS peut contribuer à la stabilisation de la coopération. De plus, il pourrait être envisagé d'investiguer l'effet de la condition nutritionnelle sur la régulation des rhamnolipides par QS en condition « *swarming* ».

Nos résultats ont également démontré que la régulation des rhamnolipides par le QS est facultative et ceci suggère la présence d'autres facteurs de régulation impliqués dans le contrôle de la production des rhamnolipides indépendamment du QS. Donc, pour la suite de ce projet, nous proposons d'effectuer une mutagenèse aléatoire sur le mutant *tofl* avec un rapporteur chromosomique *rhIA*'-lux. Un criblage en cultivant sur un milieu de culture permettant la production de rhamnolipides en absence de QS, en utilisant un rapporteur chromosomique *rhIA*'-lux, nous permettra d'obtenir des mutants affectés dans la transcription des gènes de l'opéron *rhI* et ainsi d'identifier les facteurs de régulation impliqués dans le contrôle de la production des rhamnolipides indépendamment du QS. D'ailleurs, dans l'objectif de mieux comprendre la régulation des rhamnolipides chez *B. glumae*, le criblage d'une banque de mutants de la souche sauvage générée par transposons a été effectuée (présenté dans l'annexe, section 5.2). L'identification des sites d'insertion des transposons dans les différents mutants affectés dans la production des rhamnolipides en cours au laboratoire permettra l'identification des gènes

impliqués dans la production des rhamnolipides et, enfin, de trouver des mutants surproducteurs. De plus, la caractérisation des facteurs de régulation contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides sera importante pour optimiser la production de ces derniers. Une autre étape importante qui pourra être envisagée est de cribler une collection de souches pour identifier des surproductrices naturelles. En effet, la comparaison des taux de production que nous avons obtenus au cours des dernières années avec deux souches différentes (AU6208 et BGR1) suggèrent une grande diversité dans ce phénotype.

Par ailleurs, compte tenu de nos résultats rapportés à la section 2.1 concernant du rôle des rhamnolipides dans la motilité du type « *swarming* », afin de trouver les mutants surproducteurs des rhamnolipides, il pourrait être envisagé d'effectuer une expérience de l'évolution dirigée s'inspiré des travaux Van Ditmarsch *et al.* (2013) dans laquelle les passages consécutifs des colonies de *B. glumae* en condition « *swarming* » peut favoriser l'émergence des mutants qui surproduit les rhamnolipides car leur surproduction donne un avantage concurrentiel. Cependant, il faut aussi remarquer que comme les rhamnolipides sont les biens publics, les tricheurs qui ne produit pas des rhamnolipides peuvent gagner des bénéfices de leur production par les cellules surproductrices.

Les stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences tels que la méthodologie des surfaces de réponse (MSR), sont fréquemment utilisées pour la modélisation et l'optimisation des processus biologiques. L'avantage majeur de ces approches est qu'en réduisant le nombre d'essais nécessaires à étudier par rapport à une expérimentation facteur par facteur, ils permettent d'économiser les coûts associés au plan d'expériences.

Ainsi, dans le cadre d'optimisation du milieu de culture pour la production des rhamnolipides, mes objectifs de recherches s'inscrivaient dans une approche classique à développer un milieu de culture minimal afin d'améliorer la production des rhamnolipides en procédant à l'optimisation des composants des milieux nutritifs comme, par exemple, les sources de carbone et d'azote. Ainsi, les résultats de cet objectif ont été présentés dans notre article rapporté à la section 2.3 qui est en préparation à être soumis pour publication. Nos résultats ont montré que l'urée et le mannitol sont les meilleures sources d'azote et de carbone à être utilisées parmi ceux testés. Ensuite, dans le but de déterminer les conditions de culture qui ont un effet significatif sur la production des rhamnolipides, le plan d'expérience factorielle fractionnaire a été effectué. Ainsi, le potassium, le mannitol, le calcium et l'urée ont été identifiés comme ayant un effet significatif sur la production des rhamnolipides par *B. glumae*. Finalement, les valeurs de ces facteurs ont été optimisées à l'aide de l'application de la méthodologie des surfaces de

réponse et une production rhamnolipides de 1,66 g/L a été obtenue ce qui était cinq fois plus élevé qu'en suivant les conditions initiales avant MSR. En effet, afin d'évaluer l'adéquation et la signification du modèle pour la prédiction des réponses du système, il devrait envisager d'effectuer une série d'expériences avec les paramètres indépendants de ceux qui ont été utilisés pour l'obtention des modèles statistiques. Ainsi, la comparaison des valeurs empiriques et théoriques de production nous permettra de voir si les modèles sont fiables.

En effet, la compréhension de la régulation de la production des rhamnolipides chez *B. glumae* BGR1 nous a d'abord conduit à étudier les facteurs géniques impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides. Dans un deuxième temps, dans le but de développer un milieu de culture qui favorise la production des rhamnolipides chez *B. glumae*, nous avons entrepris d'utiliser les méthodes statistiques pour déterminer les facteurs critiques pour une amélioration de la production des rhamnolipides chez *B. glumae*. Cependant, pour le développement d'un processus économiquement viable, l'intégration de notre compréhension de la biosynthèse de rhamnolipide et de sa régulation avec notre connaissance des conditions de culture est un enjeu crucial.

Ainsi, en ce qui concerne l'étude de l'optimisation pour une éventuelle application industrielle, l'utilisation du rapporteur transcriptionnel *rhIA'-lux* dans toutes les étapes d'optimisation pourrait permettre de mieux comprendre les effets des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes responsables pour la biosynthèse des rhamnolipides.

Compte tenu de nos résultats concernant du rôle de système QS TofR/TofI dans la régulation de la production de rhamnolipides chez *B. glumae*, l'ensemble des résultats présentés dans les sections 2.2 et 2.3 nous suggère qu'un taux de croissance ralenti, non seulement peut induire une expression plus élevée des gènes responsables de la biosynthèse des rhamnolipides par l'implication du système QS (section 2.2), mais également peut augmenter le rendement de conversion du substrat en rhamnolipides ( $Y_{P/S}$ ) (section 2.3). Ce dernier est très importants car idéalement, afin d'obtenir des rendements optimaux des rhamnolipides, des taux de production élevés sans formation de la biomasse sont souhaitables. Ainsi, une optimisation plus poussée impliquera presque certainement (a) une compréhension plus précise des mécanismes de régulation en analysant des résultats des mutagenèses aléatoires et (b) l'élaboration de stratégies de culture qui favorisent un rendement de conversion du substrat plus élevé, tel que la culture en mode continu dans des conditions limitantes. Finalement, les souches surproductrices obtenue à partir de la mutagenèse aléatoire pourront également être utilisé dans les conditions de culture optimisées.

En conclusion, les résultats rapportés dans cette thèse améliorent les connaissances sur la régulation des rhamnolipides chez *B. glumae*. À plus long terme, cet ouvrage contribuera à l'identification de l'étape limitante dans la biosynthèse des rhamnolipides et la régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides par le QS chez *B. glumae*.

## 4 BIBLIOGRAPHIE

- Abalos A, Maximo F, Manresa MA & Bastida J (2002) Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77(7):777-784.
- Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F & Manresa A (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17(5):1367-1371.
- Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lépine F, Müller MM & Déziel E (2011) Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production *Biosurfactants*, (Microbiology Monographs, Soberón-Chávez G (Édit.) Springer Berlin / Heidelberg, Vol 20. p 13-55.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(5):1323-1336.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014a) Liquid chromatography/mass spectrometry for the identification and quantification of rhamnolipids. *Methods Mol Biol* 1149:359-373.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014b) A Stereospecific Pathway Diverts  $\beta$ -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. *Chem. Biol.* 21(1):156-164.
- Abouseoud M, Yataghene A, Amrane A & Maachi R (2008) Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35(11):1303-1308.
- Al-Tahhan RA, Sandrin TR, Bodour AA & Maier RM (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8):3262-3268.
- An JH, Goo E, Kim H, Seo YS & Hwang I (2014) Bacterial quorum sensing and metabolic slowing in a cooperative population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(41):14912-14917.
- Andra J, Rademann J, Howe J, Koch MH, Heine H, Zahringer U & Brandenburg K (2006) Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biol. Chem.* 387(3):301-310.
- Ashby RD, McAloon AJ, Solaiman DKY, Yee WC & Reed M (2013) A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids. *Journal of Surfactants and Detergents* 16(5):683-691.
- Bainton NJ, Bycroft BW, Chhabra SR, Stead P, Gledhill L, Hill PJ, Rees CE, Winson MK, Salmond GP & Stewart GS (1992) A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* 116(1):87-91.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ & Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2):427-444.
- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R & Nyayanit NV (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol* 5:697.

- Bassler BL (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109(4):421-424.
- Beal R & Betts WB (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 89(1):158-168.
- Becher A & Schweizer HP (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* 29(5):948-950, 952.
- Benincasa M, Contiero J, Manresa MA & Moraes IO (2002) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J. Food Eng.* 54(4):283-288.
- Bergström S, Theorell H & David H (1946) On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*. Pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. *Arkiv Chem Mineral Geol* 23A(13):1-12.
- Boekema BK, Beselin A, Breuer M, Hauer B, Koster M, Rosenau F, Jaeger KE & Tommassen J (2007) Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(12):3838-3844.
- Boyle KE, Monaco H, van Ditmarsch D, Deforet M & Xavier JB (2015) Integration of Metabolic and Quorum Sensing Signals Governing the Decision to Cooperate in a Bacterial Social Trait. *PLoS Comp. Biol.* 11(5):e1004279.
- Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT & F. K (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer,, New York, 2nd. 1388 p. pp.
- Burch AY, Shimada BK, Browne PJ & Lindow SE (2010) Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(16):5363-5372.
- Burger MM, Glaser L & Burton RM (1963) The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid by Extracts of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238:2595-2602.
- Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F & Soberón-Chávez G (2006) Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73(1):187-194.
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189(9):3603-3612.
- Cha M, Lee N, Kim M, Kim M & Lee S (2008) Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.* 99(7):2192-2199.
- Chapalain A, Vial L, Laprade N, Dekimpe V, Perreault J & Déziel E (2013) Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*. *MicrobiologyOpen* 2(2):226-242.
- Chayabutra C, Wu J & Ju LK (2001) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 72(1):25-33.
- Chen R, Barphagha IK & Ham JH (2015) Identification of potential genetic components involved in the deviant quorum-sensing signaling pathways of *Burkholderia glumae* through a functional genomics approach. *Front Cell Infect Microbiol* 5:22.
- Chen RX, Barphagha IK, Karki HS & Ham JH (2012) Dissection of Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia glumae* Reveals Non-Canonical Regulation and the New Regulatory Gene *tofM* for Toxoflavin Production. *PLoS ONE* 7(12):e52150.

- Chen SY, Wei YH & Chang JS (2007) Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(1):67-74.
- Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR & Schweizer HP (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2(6):443-448.
- Choi KH, Mima T, Casart Y, Rholl D, Kumar A, Beacham IR & Schweizer HP (2008) Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4):1064-1075.
- Choudhary KS, Hudaiberdiev S, Gelencser Z, Goncalves Coutinho B, Venturi V & Pongor S (2013) The organization of the quorum sensing luxI/R family genes in *Burkholderia*. *Int J Mol Sci* 14(7):13727-13747.
- Christova N, Tuleva B, Lalchev Z, Jordanova A & Jordanov B (2004) Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. *Z Naturforsch C* 59(1-2):70-74.
- Chrzanowski L, Dziadas M, Lawniczak L, Cyplik P, Bialas W, Szulc A, Lisiecki P & Jelen H (2012) Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresour. Technol.* 111:328-335.
- Chrzanowski L, Lawniczak L & Czaczyk K (2011) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10.1007/s11274-011-0854-8:1-19.
- Chrzanowski L, Stasiewicz M, Owsianiak M, Szulc A, Piotrowska-Cyplik A, Olejnik-Schmidt AK & Wyrwas B (2009) Biodegradation of diesel fuel by a microbial consortium in the presence of 1-alkoxymethyl-2-methyl-5-hydroxypyridinium chloride homologues. *Biodegradation* 20(5):661-671.
- Chun H, Choi O, Goo E, Kim N, Kim H, Kang Y, Kim J, Moon JS & Hwang I (2009) The quorum sensing-dependent gene *katG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light. *J. Bacteriol.* 191(13):4152-4157.
- Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, van Delden C, Curty LK & Kohler T (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J. Bacteriol.* 184(11):3027-3033.
- Costa SGVAO, Déziel E & Lépine F (2011) Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 53(6):620-627.
- Costa SGVAO, Lépine F, Milot S, Déziel E, Nitschke M & Contiero J (2009) Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(8):1063-1072.
- Costa SGVAO, Nitschke M, Lépine F, Déziel E & Contiero J (2010) Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochem.* 45(9):1511-1516.
- Dandekar AA, Chugani S & Greenberg EP (2012) Bacterial Quorum Sensing and Metabolic Incentives to Cooperate. *Science* 338(6104):264-266.
- Daniels R, Vanderleyden J & Michiels J (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(3):261-289.

- Darch SE, West SA, Winzer K & Diggle SP (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(21):8259-8263.
- Davey ME, Caiazza NC & O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185(3):1027-1036.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280(5361):295-298.
- De Guertechin LO (1999) Surfactants: Classification. *Handbook of Detergents Part A: Properties*, (Surfactant science series, Broze G (Édit.) CRC Press, Vol 82. p 7-46.
- de Vargas Roditi L, Boyle KE & Xavier JB (2013) Multilevel selection analysis of a microbial social trait. *Mol. Syst. Biol.* 9(1).
- Deepika KV, Kalam S, Ramu Sridhar P, Podile AR & Bramhachari PV (2016) Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5:38-47.
- Desai JD & Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1):47-64.
- Devescovi G, Bigirimana J, Degrassi G, Cabrio L, LiPuma JJ, Kim J, Hwang I & Venturi V (2007) Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(15):4950-4958.
- Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA & Villemur R (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta* 1440(2-3):244-252.
- Déziel E, Lépine F, Milot S & Villemur R (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149(Pt 8):2005-2013.
- Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS & West SA (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450(7168):411-414.
- Dubeau D, Déziel E, Woods DE & Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* 9:263.
- Dubey KV, Juwarkar AA & Singh SK (2005) Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 21(3):860-867.
- Dumais JP (2010) *Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez Burkholderia ambifaria et B. thailandensis*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique, Québec).
- Dusane DH, Zinjarde SS, Venugopalan VP, McLean RJ, Weber MM & Rahman PK (2010) Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Eng Rev* 27:159-184.



- Edwards KR, Lepo JE & Lewis MA (2003) Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Mar. Pollut. Bull.* 46(10):1309-1316.
- Funston SJ, Tsaousi K, Rudden M, Smyth TJ, Stevenson PS, Marchant R & Banat IM (2016) Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(18):7945-7956.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176(2):269-275.
- Giani C, Wullbrandt D, Rothert R & Meiwes J (1996) *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. Brevet US5501966 Attribué.
- Glaser L & Kornfeld S (1961) The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugars. II. Thymidine diphosphate L-rhamnose. *J. Biol. Chem.* 236:1795-1799.
- Goo E, An JH, Kang Y & Hwang I (2015) Control of bacterial metabolism by quorum sensing. *Trends Microbiol.* 23(9):567-576.
- Goo E, Kang Y, Kim H & Hwang I (2010) Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*. *J Proteome Res* 9(6):3184-3199.
- Goo E, Majerczyk CD, An JH, Chandler JR, Seo YS, Ham H, Lim JY, Kim H, Lee B, Jang MS, Greenberg EP & Hwang I (2012) Bacterial quorum sensing, cooperativity, and anticipation of stationary-phase stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(48):19775-19780.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2):301-305.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(6):443-448.
- Gunther NW, Nunez A, Fett W & Solaiman DKY (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2288-2293.
- Guo-liang Z, Yue-ting W, Xin-ping Q & Qin M (2005) Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University - Science B* 6(8):725-730.
- Gupta R, Gobble TR & Schuster M (2009) GidA Posttranscriptionally Regulates *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191(18):5785-5792.
- Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR & Manresa A (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* 81(3):316-322.
- Haferburg D, Hommel R, Kleber HP, Kluge S, Schuster G & Zschiegner HJ (1987) Antiphytovirale Aktivität von Rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biotechnol.* 7(4):353-356.
- Ham JH, Melanson RA & Rush MC (2011) *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.* 12(4):329-339.
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning* 1:109-135.
- Hauser G & Karnovsky ML (1954) Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 68(6):645-654.

- Haussler S, Nimtze M, Domke T, Wray V & Steinmetz I (1998) Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 66(4):1588-1593.
- Haussler S, Rohde M, von Neuhoff N, Nimtze M & Steinmetz I (2003) Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infect. Immun.* 71(5):2970-2975.
- Henkel M, Müller MM, Kügler JH, Lovaglio RB, Contiero J, Syldatk C & Hausmann R (2012) Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem.* 47(8):1207-1219.
- Hense BA & Schuster M (2015) Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79(1):153-169.
- Heyd M (2009) *Continuous production of rhamnolipids by means of process integration*. (Karlsruhe, Univ., Diss., 2009).
- Heyd M, Franzreb M & Berensmeier S (2011) Continuous rhamnolipid production with integrated product removal by foam fractionation and magnetic separation of immobilized *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Prog.* 27(3):706-716.
- Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, Kirschhofer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M & Berensmeier S (2008) Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal. Bioanal. Chem.* 391(5):1579-1590.
- Hikichi Y, Okuno K & Furusawa I (1993) Immunofluorescent antibody technique for detecting *Pseudomonas glumae* on rice plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59:477-480.
- Hirata Y, Ryu M, Oda Y, Igarashi K, Nagatsuka A, Furuta T & Sugiura M (2009) Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *J. Biosci. Bioeng.* 108(2):142-146.
- Hisatsuk KI, Nakahara T, Sano N & Yamada K (1971) Formation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and Its Function in Hydrocarbon Fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 35(5):686-692.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Hörmann B, Müller MM, Syldatk C & Hausmann R (2010) Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112(6):674-680.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S & Eberl L (2001) The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147(Pt 9):2517-2528.
- Itoh S, Honda H, Tomita F & Suzuki T (1971) Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Paraffin (Mixture of C12, C13 and C14 Fractions). *J. Antibiot.* 24(12):855-859.
- Itoh S & Suzuki T (1972) Effect of Rhamnolipids on Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Mutant Deficient in Paraffin-Utilizing Ability. *Agric. Biol. Chem.* 36(12):2233-2235.
- Ivanković T & Hrenović J (2010) Surfactants in the environment. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 61(1):95-110.

- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV & Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24):14339-14344.
- Jang MS, Goo E, An JH, Kim J & Hwang I (2014) Quorum Sensing Controls Flagellar Morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS One* 9(1):e84831.
- Jarvis FG & Johnson MJ (1949) A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71(12):4124-4126.
- Jensen V, Lons D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, Dieterich G, Munch R & Haussler S (2006) RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J. Bacteriol.* 188(24):8601-8606.
- Jeong HS, Lim DJ, Hwang SH, Ha SD & Kong JY (2004) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads. *Biotechnol. Lett.* 26(1):35-39.
- Jeong Y, Kim J, Kim S, Kang Y, Nagamatsu T & Hwang I (2003) Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87(8):890-895.
- Karki HS, Shrestha BK, Han JW, Groth DE, Barphagha IK, Rush MC, Melanson RA, Kim BS & Ham JH (2012) Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation and DNA Fingerprint among Strains of *Burkholderia glumae*. *Plos One* 7(9):e45376.
- Kato T, Morohoshi T, Tsushima S & Ikeda T (2014) Characterization of three types of quorum-sensing mutants in *Burkholderia glumae* strains isolated in Japan. *J. Agric. Sci.* 6(7):16.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(9):634-644.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P & Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647-1649.
- Kim EJ, Sabra W & Zeng AP (2003) Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 149(9):2627-2634.
- Kim H, Goo E, Kang Y, Kim J & Hwang I (2012) Regulation of Universal Stress Protein Genes by Quorum Sensing and RpoS in *Burkholderia glumae*. *J. Bacteriol.* 194(5):982-992.
- Kim J, Kang Y, Choi O, Jeong Y, Jeong JE, Lim JY, Kim M, Moon JS, Suga H & Hwang I (2007) Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* 64(1):165-179.
- Kim J, Kim JG, Kang Y, Jang JY, Jog GJ, Lim JY, Kim S, Suga H, Nagamatsu T & Hwang I (2004) Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* 54(4):921-934.
- Kim S, Park J, Kim JH, Lee J, Bang B, Hwang I & Seo YS (2013) RNAseq-based Transcriptome Analysis of *Burkholderia glumae* Quorum Sensing. *Plant Pathol J* 29(3):249-259.
- Knapp A, Voget S, Gao R, Zaburanyi N, Krysciak D, Breuer M, Hauer B, Streit WR, Muller R, Daniel R & Jaeger KE (2015) Mutations improving production and secretion of

- extracellular lipase by *Burkholderia glumae* PG1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10.1007/s00253-015-7041-z.
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A & Reiser J (1991) Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutants. *J. Bacteriol.* 173(13):4212-4219.
- Köhler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C & Pechère J (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182(21):5990-5996.
- Kosaric N & Sukan FV (1993) *Biosurfactants: Production: Properties: Applications*. CRC Press,
- Kownatzki R, Tummeler B & Doring G (1987) Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1(8540):1026-1027.
- Lang S & Wullbrandt D (1999) Rhamnolipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(1):22-32.
- Lee HH, Park J, Kim J, Park I & Seo YS (2016) Understanding the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Curr. Genet.* 62(1):115-123.
- Lee KM, Hwang SH, Ha SD, Jang JY, Lim DJ & Kong JY (2004) Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 9(4):267-273.
- Lequette Y & Greenberg EP (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 187(1):37-44.
- Lim J, Lee TH, Nahm BH, Choi YD, Kim M & Hwang I (2009) Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *J. Bacteriol.* 191(11):3758-3759.
- Loh J, Pierson EA, Pierson LS, 3rd, Stacey G & Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(4):285-290.
- Long X, Meng Q, Sha R, Huang Q & Zhang G (2012) Two-step ultrafiltration of rhamnolipids using PSU-g-PEG membrane. *J. Membr. Sci.* 409–410:105-112.
- Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2(9):1051-1060.
- Maier RM & Soberon-Chavez G (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54(5):625-633.
- Makkar RS & Cameotra SS (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(4):428-434.
- Medina G, Juarez K, Diaz R & Soberon-Chavez G (2003) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149(Pt 11):3073-3081.
- Mellbye B & Schuster M (2011) More than just a quorum: Integration of stress and other environmental cues in acyl-homoserine lactone signaling. *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, DC:349-363.
- Mellbye B & Schuster M (2014) Physiological Framework for the Regulation of Quorum Sensing-Dependent Public Goods in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196(6):1155-1164.
- Miller MB & Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199.
- Montgomery DC (2008) *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons,

- Mukherjee S, Das P & Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24(11):509-515.
- Müller MM & Hausmann R (2011) Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91(2):251-264.
- Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, Syldatk C & Hausmann R (2012) Rhamnolipids—Next generation surfactants? *J. Biotechnol.* 162(4):366-380.
- Nandakumar R, Rush M, Shahjahan A, O'Reilly K & Groth D (2005) Bacterial panicle blight of rice in the southern United States caused by *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. *Phytopathology* 95(6):S73-S73.
- Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* 60(1):151-166.
- Nguyen TT, Youssef NH, McInerney MJ & Sabatini DA (2008) Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 42(6-7):1735-1743.
- Nickzad A & Déziel E (2014) The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Letts. Appl. Microbiol.* 58(5):447-453.
- Nickzad A, Lépine F & Déziel E (2015) Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS ONE* 10(6):e0128509.
- Nitschke M, Costa SG & Contiero J (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 21(6):1593-1600.
- Nitschke M & Costa SGVAO (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18(5):252-259.
- Nitschke M & Pastore GM (2003) Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105:295-301.
- Noah KS, Bruhn DF & Bala GA (2005) Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121:465-473.
- Noordman WH & Janssen DB (2002) Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9):4502-4508.
- Ochsner UA, Fiechter A & 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(31):19787-19795.
- Ochsner UA, Hembach T & Fiechter A (1996) Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 53:89-118.
- Ochsner UA & Reiser J (1995a) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(14):6424-6428.
- Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A & Witholt B (1995b) Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(9):3503-3506.
- Oh J, Goo E, Hwang I & Rhee S (2014) Structural Basis for Bacterial Quorum Sensing-mediated Oxalogenesis. *J. Biol. Chem.* 289(16):11465-11475.

- Olvera C, Goldberg JB, Sanchez R & Soberon-Chavez G (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179(1):85-90.
- Pai A, Tanouchi Y & You L (2012) Optimality and robustness in quorum sensing (QS)-mediated regulation of a costly public good enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(48):19810-19815.
- Pajarron AM, Dekoster CG, Heerma W, Schmidt M & Haverkamp J (1993) Structure Identification of Natural Rhamnolipid Mixtures by Fast-Atom-Bombardment Tandem Mass-Spectrometry. *Glycoconjugate J.* 10(3):219-226.
- Pamp SJ & Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189(6):2531-2539.
- Partridge JD & Harshey RM (2013) Swarming: flexible roaming plans. *J. Bacteriol.* 195(5):909-918.
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L & Iglewski BH (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260(5111):1127-1130.
- Pearson JP, Pesci EC & Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179(18):5756-5767.
- Platt TG & Bever JD (2009) Kin competition and the evolution of cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 24(7):370-377.
- Platt TG & Fuqua C (2010) What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends Microbiol.* 18(9):383-387.
- Poremba K, Gunkel W, Lang S & Wagner F (1991) Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z Naturforsch C* 46(3-4):210-216.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS & Soberon-Chavez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40(3):708-718.
- Rahman KS, Rahman TJ, McClean S, Marchant R & Banat IM (2002) Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnol. Prog.* 18(6):1277-1281.
- Ramana KV & Karanth NG (1989) Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 45(4):249-257.
- Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A, Shryock T, Hall R, McDonald-Gibson W, Lund V, Taylor G & et a (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* 72(6):2271-2277.
- Reiling HE, Thanei-Wyss U, Guerra-Santos LH, Hirt R, Käppeli O & Fiechter A (1986) Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5):985-989.
- Rooney AP, Price NPJ, Ray KJ & Kuo T (2009) Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol. Lett.* 295(1):82-87.

- Sabra W, Kim EJ & Zeng A (2002) Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* 148(10):3195-3202.
- Sandoz KM, Mitzimberg SM & Schuster M (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(40):15876-15881.
- Sarachat T, Pornsunthorntawe O, Chavadej S & Rujiravanit R (2010) Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresour. Technol.* 101(1):324-330.
- Sato Z, Koiso Y, Iwasaki S, Matsuda I & Shirata A (1989) Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 55(3):353-356.
- Schaad NW, Jones JB & Chun W (2001) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., 3rd. xii, 373 pp.
- Schmidberger A, Henkel M, Hausmann R & Schwartz T (2014) Influence of ferric iron on gene expression and rhamnolipid synthesis during batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(15):6725-6737.
- Schooling SR, Charaf UK, Allison DG & Gilbert P (2004) A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* 1(02):91-99
- Schuster M & Greenberg EP (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(2-3):73-81.
- Schuster M, Sexton DJ, Diggle SP & Greenberg EP (2013) Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:43-63.
- Sen R & Swaminathan T (1997) Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47(4):358-363.
- Sen R & Swaminathan T (2004) Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem. Eng. J.* 21(2):141-148.
- Shreve GS, Inguva S & Gunnam S (1995) Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4(4):331-337.
- Siemann M & Wagner F (1993) Prospects and limits for the production of biosurfactant using immobilized biocatalysts. *Kosaric N (ed) Surfactant science series – Biosurfactants*, Marcel Dekker, New York, Vol 48. p 99-133.
- Simon R, Priefer U & Puhler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1(9):784-791.
- Smith RS & Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(1):56-60.
- Soares Dos Santos A, Pereira N, Jr. & Freire DM (2016) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ* 4:e2078.
- Soberon-Chavez G, Lépine F & Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(6):718-725.

- Stanghellini ME & Miller RM (1997) BIOSURFACTANTS: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. *Plant Dis.* 81(1):4-12.
- Stevens AM & Greenberg EP (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* 179(2):557-562.
- Syldatk C, Lang S, Matulovic U & Wagner F (1985) Production of 4 Interfacial Active Rhamnolipids from Normal-Alkanes or Glycerol by Resting Cells of *Pseudomonas* Species Dsm 2874. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 40(1-2):61-67.
- Tans-Kersten J, Huang H & Allen C (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183(12):3597-3605.
- Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA & Ceri H (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):5208-5218.
- Tremblay J (2007) *Caractérisation de la motilité de type swarming chez Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Tremblay J & Déziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microb* 48(6):509-515.
- Tremblay J & Déziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11:587.
- Tremblay J, Richardson AP, Lépine F & Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9(10):2622-2630.
- Tuleva BK, Ivanov GR & Christova NE (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57(3-4):356-360.
- Van Delden C, Comte R & Bally AM (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183(18):5376-5384.
- Van Delden C, Pesci EC, Pearson JP & Iglewski BH (1998) Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect. Immun.* 66(9):4499-4502.
- Van Ditmarsch D, Boyle KE, Sakhtah H, Oyler JE, Nadell CD, Deziel E, Dietrich LE & Xavier JB (2013) Convergent evolution of hyperswarming leads to impaired biofilm formation in pathogenic bacteria. *Cell Rep* 4(4):697-708.
- Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieux F & Dorey S (2010) Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *Int J Mol Sci* 11(12):5095-5108.
- Von Bodman SB, Bauer WD & Coplin DL (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:455-482.
- Walter V, Syldatk C, Hausmann R & Flickinger MC (2009) Biosurfactants, Rhaminolipid, Microbial Production. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Wang MZ, Schaefer AL, Dandekar AA & Greenberg EP (2015) Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112(7):2187-2191.



- Wang QH, Fang XD, Bai BJ, Liang XL, Shuler PJ, Goddard WA & Tang YC (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):842-853.
- Wang XL, Gong LY, Liang SK, Han XR, Zhu CJ & Li YB (2005) Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* 4(2):433-443.
- Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21:319-346.
- Wei YH, Cheng CL, Chien CC & Wan HM (2008) Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. *Process Biochem.* 43(7):769-774.
- Wei YH, Chou CL & Chang JS (2005) Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem. Eng. J.* 27(2):146-154.
- West SA, Griffin AS, Gardner A & Diggle SP (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(8):597-607.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(4):365-404.
- Williams P & Camara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(2):182-191.
- Winsor GL, Khaira B, Van Rossum T, Lo R, Whiteside MD & Brinkman FS (2008) The Burkholderia Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses. *Bioinformatics* 24(23):2803-2804.
- Witek-Krowiak A, Witek J, Gruszczyńska A, Szafran RG, Koźlecki T & Modelski S (2011) Ultrafiltrative separation of rhamnolipid from culture medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(8):1961-1964.
- Xavier JB, Kim W & Foster KR (2011) A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79(1):166-179.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1993) Proposal of Burkholderia Gen-Nov and Transfer of 7 Species of the Genus Pseudomonas Homology Group-li to the New Genus, with the Type Species Burkholderia-Cepacia (Palleroni and Holmes 1981) Comb-Nov (Vol 36, Pg 1251, 1992). *Microbiol. Immunol.* 37(4):335-335.
- Zhang YM & Miller RM (1994) Effect of a Pseudomonas Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6):2101-2106.
- Zhao F, Mandlaa M, Hao J, Liang X, Shi R, Han S & Zhang Y (2014) Optimization of culture medium for anaerobic production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl for microbial enhanced oil recovery. *Letf. Appl. Microbiol.* 59(2):231-237.
- Zhu, Yang X, Xue C, Chen Y, Qu L & Lu W (2012) Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. *Bioresour. Technol.* 117:208-213.
- Zhu K & Rock CO (2008) RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190(9):3147-3154.

Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS & Meda P (2006) Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74(6):3134-3147.

## 5 ANNEXES

## **5.1 Annexe A: mini-revue: The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control?**

**Arvin Nickzad** and **Éric Déziel\***

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

**Journal:** Letters in Applied Microbiology

**Soumission :** 28 août, 2013

**Acceptation :** 20 décembre, 2013

**Publication :** 24 janvier, 2014

**DOI :** 10.1111/lam.12211

**Citation :** Nickzad, A., & Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development—an approach for control?. *Letters in applied microbiology*, 58(5), 447-453.

**Contribution :** Nickzad a écrit le manuscrit et Dr. Déziel a révisé le manuscrit.

## Résumé

Les biofilms sont omniprésents dans les milieux cliniques et industriels, et la plupart du temps provoquent des effets secondaires néfastes. Elaborer des stratégies efficaces pour contrôler les communautés microbiennes adhérentes aux surfaces demeure un défi important. Les rhamnolipides sont des métabolites secondaires extracellulaires ayant des propriétés tensioactives principalement produites par *Pseudomonas aeruginosa*. De plus en plus, il existe des preuves de l'implication de ces biosurfactants à différents stades de développement des biofilms de cette bactérie. De plus, les rhamnolipides présentent un potentiel significatif en tant qu'agents antiadhésifs et perturbateurs contre des biofilms établis formés par plusieurs espèces bactériennes et fongiques. Leur faible toxicité, leur biodégradabilité, leur efficacité et leur spécificité, par rapport aux agents tensioactifs synthétiques habituellement utilisés pour le contrôle des biofilms, pourraient compenser l'obstacle économique toujours lié à leurs coûts de production élevés.

### 5.1.1 Abstract

Biofilms are omnipresent in clinical and industrial settings and most of the times cause detrimental side effects. Finding efficient strategies to control surface-growing communities of microorganisms remains a significant challenge. Rhamnolipids are extracellular secondary metabolites with surface active properties mainly produced by *Pseudomonas aeruginosa*. There is growing evidence for the implication of this biosurfactant in different stages of biofilm development of this bacterium. Furthermore, rhamnolipids display a significant potential as anti-adhesive and disrupting agents against established biofilms formed by several bacterial and fungal species. Their low toxicity, biodegradability, efficiency and specificity, compared to synthetic surfactants typically used in biofilm control, might compensate for the economic hurdle still linked to their superior production costs and make them promising antifouling agents.

### 5.1.2 Introduction

Our idea of bacteria's lifestyle as loner planktonic organisms has dramatically changed; we rather consider them now as highly social organisms living in communities (Shapiro 1998). Living in a sessile community (typically a biofilm) is a trait which highly increases the survival fitness of bacteria facing unpredictable fluctuating and adverse conditions in their surroundings through augmenting their rate of adaptation and defense mechanisms (Davey and O'Toole 2000).

However, from our perspective, though often beneficial, biofilms are mostly regarded as harmful as they pose serious problems in industrial or clinical environment, either acting as biofouling agents or being the cause of the most resilient chronic medical device-associated infections in hospitalized patients (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

This has led many studies to focus on identifying potential targets to control the detrimental biofilms both in industrial and clinical settings (Davies *et al.* 1998; Donlan 2009; Rendueles and Ghigo 2012).

In spite of recognizing potential targets, no efficient antibiofilm products have found way to the market yet, and this has been largely attributed to economic issues (Romero and Kolter 2011). It is believed that finding an agent which targets a population-level trait and hence abolishes the chance of inducing resistance against its own action is highly promising and could weigh up against the existing economic hurdles (Boyle *et al.* 2013).

### **5.1.3 Biosurfactants and their role in biofilms**

Biosurfactants are amphipathic molecules produced by a variety of bacteria, fungi, and yeasts. Formed of both hydrophobic and hydrophilic moieties, these molecules act as surface active agents in the microbial world and come with structural diversity and environmental compatibility (Desai and Banat 1997). Although several important functions for biosurfactants are known, questions remain concerning their natural roles, and the mechanisms behind their production (Chrzanowski *et al.* 2012).

A number of studies have addressed the role of biosurfactants production in biofilm formation by different microorganisms (Mireles *et al.* 2001; Walencka *et al.* 2008; Rivardo *et al.* 2009; Kanmani *et al.* 2011). For example, Kuiper *et al.* (2004) have shown that production of lipopeptide biosurfactants (putisolvins) by *Pseudomonas putida* is involved in development of its biofilm. Furthermore, putisolvins were not only able to inhibit the formation of biofilms by other *Pseudomonas* species, but also disrupt established ones. Similarly, the biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* was effective in decreasing the initial adhesion of four bacterial and two yeast strains isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber (Rodrigues *et al.* 2006a). Actually, the general potential of biosurfactants in altering cell surface properties of different microorganisms and hence, interfering with initial adhesion to solid surfaces and biofilm formation are increasingly investigated (Ron and Rosenberg 2001; Flemming and Wingender 2010; Rendueles and Ghigo 2012).

Probably the best studied model to investigate the involvement of a biosurfactant in adhesion and biofilm development is production of rhamnolipids in biofilms of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipids which were first discovered in 1946 by Bergström *et al.*, are glycolipid biosurfactants typically constituted of a dimer of 3-hydroxy fatty acids linked *via* an O-glycosidic bond to a mono- or di-rhamnose moiety (Jarvis and Johnson 1949). In *P. aeruginosa*, these molecules play an indispensable role in the establishment of the biofilm lifestyle as they are involved in different stages of biofilm development, upon the earliest cell-to-surface interactions to maintenance and dispersion/disruption of the biofilm architecture (Davey *et al.* 2003). Rhamnolipids can function as virulence factor as they mediate the active dispersal of cells from biofilms, helping in the colonization of new sites and niches (Schooling *et al.* 2004). Moreover, they act as key protective agents of *P. aeruginosa* biofilm against phagocytes (Van Gennip *et al.* 2009). Besides, rhamnolipids display low toxicity, high biodegradability and effectiveness of their surface active properties at wide range of temperatures, pH and salinity (Banat *et al.* 2000; Abdel-Mawgoud *et al.* 2011). The above evidences suggest that rhamnolipids might represent an attractive target to be exploited against their own producers and other biofilm-forming microbes to control the colonization of surfaces.

In this review, we discuss the role of rhamnolipids in the development of biofilms and highlight their potential not only to disperse bacteria and fungi from biofilms, but also prevent their formation.

#### **5.1.4 Rhamnolipids are actively involved in different stages of biofilm development**

The first published insights about the role of rhamnolipids in the structural regulation of biofilm development showed the ambivalent influence of rhamnolipids on impediment of biofilm development of *P. aeruginosa* depending on the spatiotemporal action of rhamnolipids; although the exogenous addition of rhamnolipids impedes initial bacterial adhesion, it had no effect on preformed biofilm (Davey *et al.* 2003). However, endogenous production of rhamnolipids in the biofilm could interfere with the final stages of biofilm formation (Davey *et al.* 2003). Hence, it could be concluded that the stability of the biofilm structure is dependent on the production of the appropriate amount of rhamnolipids at the right moment. Indeed, rhamnolipid producers have evolved intricate regulatory mechanisms to fulfill the timely expression of genes responsible for rhamnolipids biosynthesis. In support of this, Lequette and Greenberg (2005) showed stage-specific expression of the *rhlAB* operon in *P. aeruginosa* biofilms. These genes encode the enzymes required for rhamnolipid biosynthesis (Ochsner *et al.* 1994a).

Moreover, regulation of rhamnolipid production in *P. aeruginosa* is controlled in a cell density-dependent manner through quorum sensing (Ochsner *et al.* 1994b; Ochsner and Reiser 1995), and exhibits partial cross-regulation by RpoS, which ensures precise timing of synthesis gene expression in biofilm, which is essential for the normal development of biofilm architecture (Medina *et al.* 2003).

#### **5.1.4.1 Adherence and microcolony formation**

For planktonic bacteria, initial adhesion to a surface can be regarded as the first and the most crucial step for further colonization (Palmer *et al.* 2007). Depending on the nature of the surface whether abiotic or biotic, multiple parameters, either nonspecific like hydrophobicity, or specific like presence of particular molecules such as lectins, ligands, or adhesins can be associated with the mechanism of adhesion (Dunne 2002). In this context, amphipathic molecules with interfacial activity like rhamnolipids have the ability to alter cell-to-surface and cell-to-cell interactions and have the potential to diminish the ability of bacteria to adhere to the surfaces (Figure 5.1b), and while their overproduction inhibits biofilm development (Davey *et al.* 2003), however, depending on the concentration of rhamnolipids present, the result can be different. For instance, low concentration of rhamnolipids affect the cell surface properties through increasing cell hydrophobicity by causing a release of lipopolysaccharide from the cell surface, thereby increasing the affinity for initial adherence of cells to a surface (Figure 5.1a) (Zhang and Miller 1994; Al-Tahhan *et al.* 2000; Raya *et al.* 2010).

Once the bacteria attach to a surface, they begin clonal propagation and surface movement to form microcolonies (O'Toole and Kolter 1998). In agreement with the specific spatiotemporal role of rhamnolipids in biofilms, Pamp and Tolker-Nielsen (2007) demonstrated that rhamnolipids are necessary for the initial microcolony formation. In fact, it seems that increased hydrophobicity of cells induced by low concentration of rhamnolipids is sufficient enough to facilitate microcolony formation through enhancing aggregation of *P. aeruginosa* cells together (Herman *et al.* 1997; Pamp and Tolker-Nielsen 2007). While rhamnolipids seem indispensable for initial microcolony formation (Pamp and Tolker-Nielsen 2007), it is suggested that under certain conditions such as iron-limited biofilms, higher production of rhamnolipids induced by iron deficiency may contribute to increased twitching motility preventing initial microcolony formation (Patriquin *et al.* 2008). Again, it appears that the quantity of the produced rhamnolipids is a key to stability and balanced formation of microcolonies (Glick *et al.* 2010).



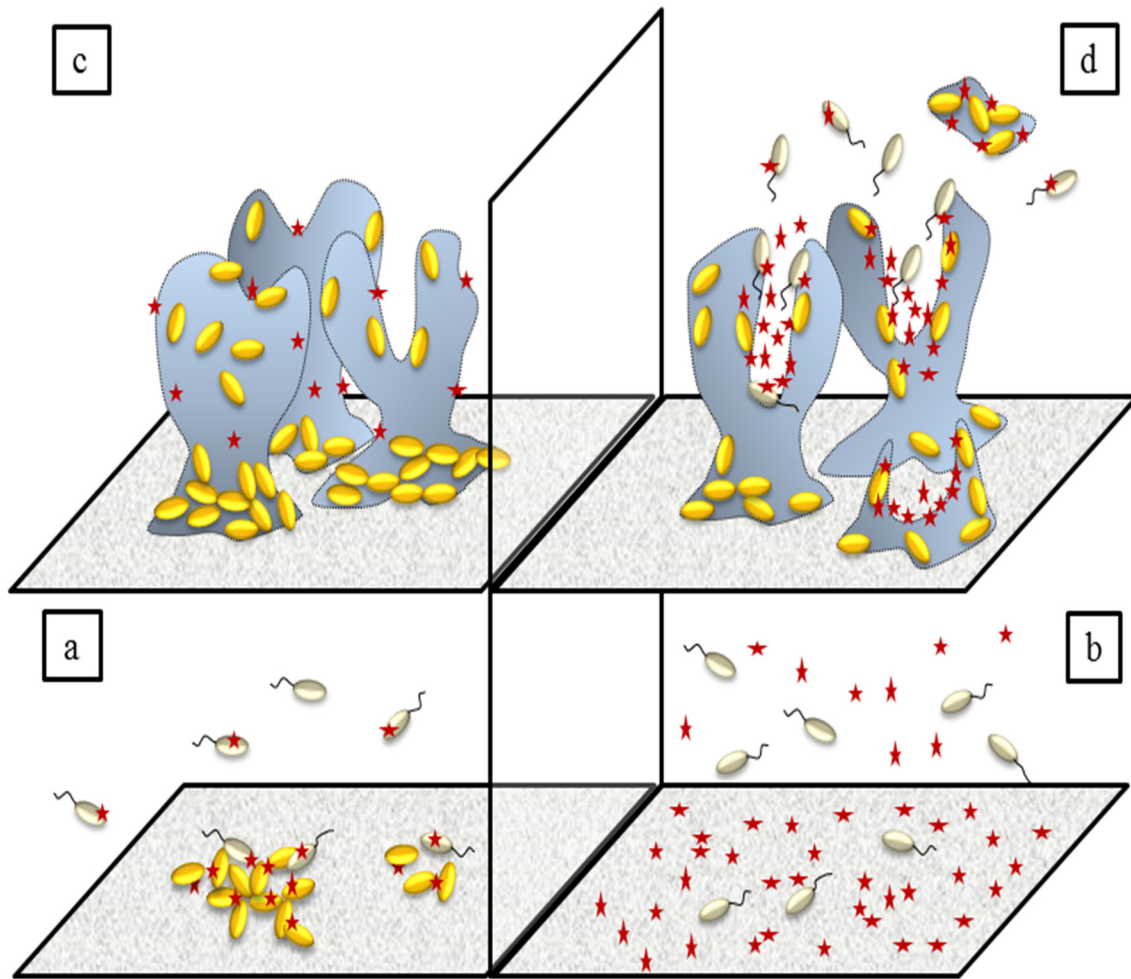
#### **5.1.4.2 Proliferation and formation of the differentiated biofilm**

In *P. aeruginosa* biofilms, at the onset of biofilm maturation, microcolonies act as platforms for formation of the stalk of the mushroom-like structures at certain foci (Klausen *et al.* 2003a; Klausen *et al.* 2003b). Then, through the emergence of a motile subpopulation, bacteria capable of migrating up the stalks form mushroom caps. For this kind of migration, bacteria require the presence of type IV pili and flagellum-mediated motility (Barken *et al.* 2008). Evidence that biosurfactant production is once again involved was presented as a *rhIA* mutant in mixed *pilA/rhIA* biofilms exhibited reduced cap formation, because of the lack of rhamnolipid production (Pamp and Tolker-Nielsen 2007). Then, once the mushroom-shaped structures are formed, another role of rhamnolipids is concerned with the maintenance of the highly hydrated structure of biofilms through prevention of colonization of the channels formed between these structures (Davey *et al.* 2003) (Figure 5.1c).

#### **5.1.4.3 Detachment and dispersion of planktonic cells**

Development of a biofilm typically culminates in the detachment and dispersal of cells (Kaplan 2010). This process has been mainly categorized into two different types of events according to the nature of the cues triggering the dispersion: passive, typically shear-dependent or active, a dynamic and highly regulated mechanism (McDougald *et al.* 2012). Seeding dispersion is an active mechanism, where detachment of cells occurs at late stages of biofilm formation and is actively mediated by rhamnolipids (Schooling *et al.* 2004; Boles *et al.* 2005; Wang *et al.* 2013). For instance, Boles *et al.* (2005) demonstrated rhamnolipid-mediated detachment mechanism involves the formation of cavities within the center of biofilm structures (Figure 5.1d).

All together, evidence shows that rhamnolipids play a central role in biofilm development. As these surface-active molecules are well known to be essential, along with flagella, for the type of surface group behavior called swarming motility (Deziel *et al.* 2003; Caiazza *et al.* 2005; Tremblay *et al.* 2007), it is hypothesized that swarming occurs inside the biofilm which leads to motility-associated dispersal (Wang *et al.* 2013).



**Figure 5.1 Representation of rhamnolipids implication in different stages of *P. aeruginosa* biofilm development.**

(a) Low concentration of rhamnolipids, increase affinity of cells for initial adherence to surfaces through increasing cell's surface hydrophobicity. (b) Presence of high concentrations of rhamnolipids in surrounding medium prevents attachment of cells and further microcolony formation. (c) At proliferation stage, rhamnolipids are actively involved in maintenance of highly hydrated structure of biofilm. (d) Rhamnolipids mediate seeding dispersion of biofilm at late stages of biofilm formation.

### 5.1.5 From evidence to action

Since biofilm development involves similar steps in most bacterial species (O'Toole *et al.* 2000) and many bacteria require the production of surface active molecules to express swarming motility (Kearns 2010; Partridge and Harshey 2013), modulating interaction between bacteria and surfaces *via* the use of biosurfactants such as rhamnolipids is naturally considered.

Indeed, Irie *et al.* (2005) demonstrated the ability of rhamnolipids to disperse pre-formed biofilms of *Bordetella bronchiseptica*. Moreover, the potent antibiofilm activity of rhamnolipids was evaluated against several microbial species associated with biofilm formation on voice prostheses and silicone rubber in the presence and absence of adsorbed rhamnolipids (Rodrigues *et al.* 2006b). The anti-adhesive activity of rhamnolipid at different concentrations was significant against all the strains and depended on the microorganism tested, with a maximal initial reduction of adhesion rate (66%) reported for strains of *Streptococcus salivarius* and *Candida tropicalis* (Rodrigues *et al.* 2006b). Furthermore, rhamnolipid conditioning of the silicon rubber caused a reduction of 48% in cell adherence of tested *Staphylococcus epidermidis*, *S. salivarius*, *Staphylococcus aureus* and *C. tropicalis* strains.

Further evidence on efficiency of rhamnolipids to inhibit initial adhesion of bacteria was recently reported by Sodagari *et al.* (2013). In this study three Gram-negative species *P. aeruginosa*, *P. putida*, and *Escherichia coli*, and two Gram-positive species *S. epidermidis* and *Bacillus subtilis* were assessed for their ability to establish biofilm on hydrophilic glass and hydrophobic octadecyltrichlorosilicone (OTS)-modified glass in presence of two different concentrations of rhamnolipids. Rhamnolipids significantly reduced the attachment of all but *S. epidermidis* on both glass and OTS-modified glass. For *S. epidermidis*, rhamnolipids reduced the attachment on OTS-modified glass but not on glass. Several mechanisms might occur and the authors investigated potential ones. For instance, rhamnolipids were found ineffective in modifying substratum surface properties and in facilitating the detachment of already attached cells, whereas rhamnolipid could inhibit the growth of *B. subtilis*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* PAO1 but not the growth of *E. coli*, *P. putida* and *P. aeruginosa* E0340. Also, rhamnolipids were found effective in changing the cell surface hydrophobicity of the tested strains; although no clear effect was observed on *B. subtilis*. Despite the observed trends on cell detachment, the authors did not find any correlation with the potential mechanisms by which rhamnolipids influence cell detachment and hence, the responsible mechanism(s) remained to be elucidated.

With regards to the biofouling problems, such as reduced heat transfer across heat exchanger surfaces, caused by bacterial biofilms in industrial settings exposed to the marine environment, Dusane *et al.* (2010) investigated the ability of rhamnolipids to inhibit adhesion and disrupt pre-formed *Bacillus pumilus* biofilms. The effectiveness of rhamnolipid to impair adhesion of *B. pumilus* cells to microtiter plates varied from 46 to 99% depending on the concentrations of the rhamnolipid investigated (0.05 to 100 mM). The minimal inhibitory concentration (MIC) of rhamnolipids against planktonically growing *B. pumilus* was 1.6 mM while a disruption of up to

93% of pre-formed *B. pumilus* biofilms was achieved at 100 mM, showing the effectiveness of rhamnolipids as promising compounds for inhibition/disruption of marine biofilms.

Apart from the efficacy of rhamnolipids against bacterial biofilms, a number of recent studies have also demonstrated the activity of rhamnolipids against fungal biofilms. Compared to conventional synthetic surfactants being used in medical settings such as cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and sodium dodecyl sulfate (SDS), Dusane *et al.* (2012) tested the potential of rhamnolipids to prevent biofilm formation and disrupt pre-established biofilms of the yeast *Yarrowia lipolytica*. In their study, pre-coating of microtitre plate wells with rhamnolipid effectively reduced *Y. lipolytica* biofilm formation by 50% as compared to CTAB, which inhibited by 29%, and SDS which decreased biofilms by less than 10% at their respective MIC values. Moreover, rhamnolipid displayed 55% dispersion of *Y. lipolytica* biofilms (formed for 3 days in microtitre plate wells with a 1 h of treatment), while 35% and 40% disruption was observed with CTAB and SDS respectively, at their respective MIC values.

Further evidence on effectiveness of rhamnolipids to disrupt fungal biofilms was recently shown by evaluating the potential of rhamnolipids to disrupt fungal biofilms of *Candida albicans* formed on polystyrene surfaces (Singh *et al.* 2013). Anti-adhesive activity of rhamnolipids on *Candida* cell adhesion was showed to be concentration-dependent. About 50% of the cells remain adhered to 96-well plate after 2 h of treatment with 0.16 mg ml<sup>-1</sup> of rhamnolipid; while up to 90% reduction in pre-established *C. albicans* biofilm on polystyrene surface was observed with rhamnolipid treatment at concentration of 5.0 mg ml<sup>-1</sup> (Singh *et al.* 2013).

### 5.1.6 Conclusion

Taken together, the available literature supports the potential of rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* as anti-adhesive and dispersing agents effective against established bacterial and fungal biofilms. Besides direct use in solution to disrupt already established biofilms in clinical and industrial settings, embedding of materials with rhamnolipids or surface coating might represent a promising approach to prevent the initial adhesion of bacteria and fungi. The environmental-friendliness and specificity of biosurfactants might compensate for the economic hurdles still linked to their superior production costs as compared to the costs of synthetic surfactants.

### 5.1.7 Acknowledgments

Investigations on rhamnolipids in the ED laboratory are funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant No. 312478. ED holds a Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

### 5.1.8 References

- Abdel-Mawgoud, A., Hausmann, R., Lépine, F., Müller, M. and Déziel, E. (2011) Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. In Biosurfactants ed. Soberón-Chávez, G. pp.13-55: Springer Berlin Heidelberg.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A. and Maier, R.M. (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 3262-3268.
- Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 495-508.
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N. and Tolker-Nielsen, T. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10, 2331-2343.
- Bergström S, Theorell H, Davide H. (1946) On a metabolic product of *Ps. pyocyania*. Pyolipic acid active against *M. tuberculosis*. *Arkiv Kemi Mineral Geol* 8, 23A-1.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K. (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 57, 1210-1223.
- Boyle, K.E., Heilmann, S., van Ditmarsch, D. and Xavier, J.B. (2013) Exploiting social evolution in biofilms. *Curr Opin Microbiol* 16, 207-212.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M. and O'Toole, G.A. (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 7351-7361.
- Chrzanowski, L., Lawniczak, L. and Czaczyk, K. (2012) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J Microbiol Biotechnol* 28, 401-419.
- Davey, M.E. and O'Toole, G., A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64, 847-867.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C. and 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. and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol R* 61, 47-64.

- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. and Villemur, R. (2003) *rhIA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol* 149, 2005-2013.
- Donlan, R.M. (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol* 17, 66-72.
- Dunne, W.M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15, 155-166.
- Dusane, D.H., Nancharaiah, Y.V., Zinjarde, S.S. and Venugopalan, V.P. (2010) Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 81, 242-248.
- Dusane, D.H., Dam, S., Nancharaiah, Y.V., Kumar, A.R., Venugopalan, V.P. and Zinjarde, S.S. (2012) Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. *Aquat Biosyst* 8, 17.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
- Glick, R., Gilmour, C., Tremblay, J., Satanower, S., Avidan, O., Deziel, E., Greenberg, E.P., Poole, K. and Banin, E. (2010) Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192, 2973-2980.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108.
- Herman, D.C., Zhang, Y. and Miller, R.M. (1997) Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 63, 3622-3627.
- Irie, Y., O'Toole G, A. and Yuk, M.H. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 250, 237-243.
- Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. (1949) A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* 71, 4124-4126.
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V. and Arul, V. (2011) Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour Technol* 102, 4827-4833.
- Kaplan, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89, 205-218.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8, 634-644.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003a) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 50, 61-68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003b) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48, 1511-1524.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J. and 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.
- Lequette, Y. and Greenberg, E.P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187, 37-44.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39-50.
- Medina, G., Juarez, K. and Soberon-Chavez, G. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* 185, 377-380.
- Mireles, J.R., 2nd, Toguchi, A. and Harshey, R.M. (2001) *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* 183, 5848-5854.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- Ochsner, U.A., Fiechter, A. and Reiser, J. (1994a) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269, 19787-19795.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A. and Reiser, J. (1994b) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176, 2044-2054.
- Ochsner, U.A. and Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6424-6428.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J. (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biot* 34, 577-588.
- Pamp, S.J. and Tolker-Nielsen, T. (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 2531-2539.
- Partridge, J.D. and Harshey, R.M. (2013) Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol* 195, 909-918.
- Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P. and Poole, K. (2008) Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190, 662-671.
- Raya, A., Sodagari, M., Pinzon, N.M., He, X., Zhang Newby, B.M. and Ju, L.K. (2010) Effects of rhamnolipids and shear on initial attachment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in glass flow chambers. *Environ Sci Pollut Res Int* 17, 1529-1538.
- Rendueles, O. and Ghigo, J.M. (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36, 972-989.

- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H. and Martinotti, M.G. (2009) Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 83, 541-553.
- Rodrigues, L., van der Mei, H., Banat, I.M., Teixeira, J. and Oliveira, R. (2006a) Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46, 107-112.
- Rodrigues, L.R., Banat, I.M., van der Mei, H.C., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. (2006b) Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol* 100, 470-480.
- Romero, D. and Kolter, R. (2011) Will biofilm disassembly agents make it to market? *Trends Microbiol* 19, 304-306.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* 3, 229-236.
- Schooling, S.R., Charaf, U.K., Allison, D.G. and Gilbert, P. (2004) A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* 1, 91-99.
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* 52, 81-104.
- Singh, N., Pemmaraju, S.C., Pruthi, P.A., Cameotra, S.S. and Pruthi, V. (2013) *Candida* Biofilm Disrupting Ability of Di-rhamnolipid (RL-2) Produced from *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20. *Appl Biochem Biotechnol* 169, 2374-2391.
- Sodagari, M., Wang, H., Newby, B.M. and Ju, L.K. (2013) Effect of rhamnolipids on initial attachment of bacteria on glass and octadecyltrichlorosilane-modified glass. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103, 121-128.
- Tremblay, J., Richardson, A.P., Lepine, F. and Deziel, E. (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* 9, 2622-2630.
- Van Gennip, M., Christensen, L.D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P.O., Christophersen, L., Pamp, S.J., Moser, C., Mikkelsen, P.J., Koh, A.Y., Tolker-Nielsen, T., Pier, G.B., Hoiby, N., Givskov, M. and Bjarnsholt, T. (2009) Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* 117, 537-546.
- Walencka, E., Rozalska, S., Sadowska, B. and Rozalska, B. (2008) The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* 53, 61-66.
- Wang, J., Yu, B., Tian, D. and Ni, M. (2013) Rhamnolipid but not motility is associated with the initiation of biofilm seeding dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA17. *J Biosci* 38, 149-156.
- Zhang, Y. and Miller, R.M. (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* 60, 2101-2106.



## 5.2 Annexe B: L'identification des régulateurs directs et indirects de l'opéron *rhIA*

Le but de cette étude était d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'opéron *rhIA* chez *B. glumae*. Pour ce faire, j'ai effectué un criblage dans lequel le critère de sélection était basé sur la différenciation des colonies affectées dans la production des rhamnolipides.

### 5.2.1 Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production des rhamnolipides

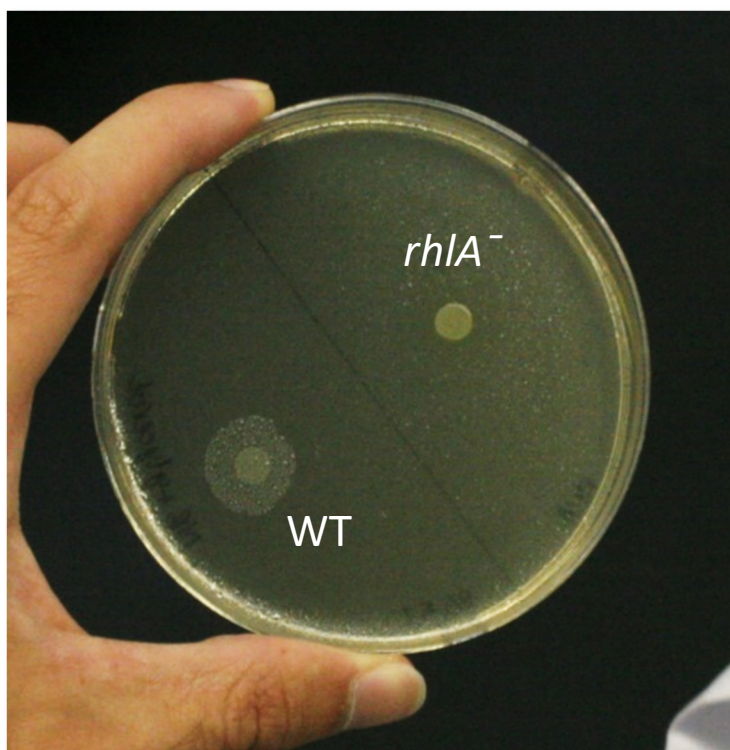
Ainsi, dans le but de nous renseigner sur les facteurs impliqués dans la production des rhamnolipides et afin de trouver des mutants sous-producteurs ou sur-producteurs, une mutagenèse aléatoire a été effectuée avec le transposon IS*lacZ*/hah. L'insertion d'un transposon dans le chromosome de *B. glumae* était effectuée par la conjugaison de *B. glumae* BGR1 avec la souche *E. coli* X7213 contenant le plasmide pIT2 (IS*lacZ*). Le transposon IS*lacZ*/hah inséré dans le plasmide pIT2 et issu à l'origine de Tn5 est un système couramment utilisé pour la génération de mutants d'insertion aléatoire chez *P. aeruginosa*. Il a, par ailleurs, déjà été utilisé à des fins de mutagenèse aléatoire chez *B. thailandensis* (Dumais, 2010). Les colonies de *B. glumae* affectées dans la biosynthèse des rhamnolipides étaient identifiées par criblage phénotypique, c'est-à-dire, en analysant la capacité de ces colonies à produire des rhamnolipides.

#### 5.2.1.1 Mutagenèse aléatoire de *B. glumae* par conjugaison

La mutagenèse aléatoire de *B. glumae* a été effectuée par conjugaison. En premier lieu, une culture sur la nuit de *B. glumae* BGR1 (ED1005) et une de *E. coli* X7213 (ED746) contenant pIT2/IS*lacZ* ont été diluées à une DO<sub>600</sub> de 0.05 pour croître jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 0.5, ce qui correspond à une incubation d'environ 5 heures à 37°C. Ensuite, les bactéries ont été récoltées par centrifugation pendant 3 minutes à 8000 x g et resuspendu dans 100 µl de NaCl 0,8% stérile. Après une incubation sur gélose (LB+DAP) de 24 heures à 37°C, les bactéries ont été récoltées et resuspendu dans une solution de NaCl 0,8% +15% de glycérol stérile. La dilution pour avoir le nombre optimal de colonies par gélose (environ 50) a été déterminée pour le criblage. Des aliquots de 1 ml de cette dilution ont été stockés à -80°C.

### 5.2.1.2 Méthodologie de criblage

Ensuite nous avons criblé les transposants par la méthode pulvérisation d'huile qui est une méthode à haut débit pour trouver les transposants avec une production affectée derhamnolipides. Un vaporisateur était utilisé pour appliquer une fine brume d'huile minérale (huile minérale légère) sur les milieux de culture gélosés suite à la croissance des colonies (Burch *et al.*, 2010). Des auréoles causées par la coalescence des gouttelettes d'huile formées autour des colonies produisant des biosurfactants pourront immédiatement être visualisées avec une source indirecte de la lumière (Figure 5.2).



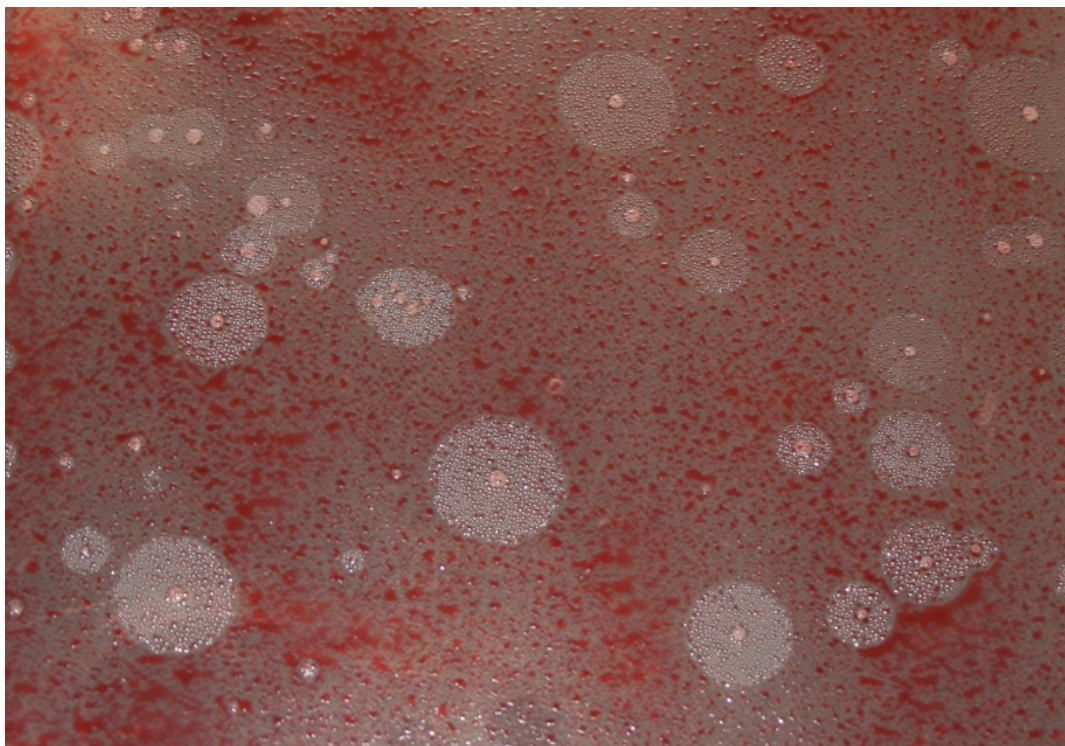
**Figure 5.2** Comparaison des gouttelettes d'huile formées autour des colonies de souche sauvage et le mutant *rhlA<sup>-</sup>*.

De plus, afin d'améliorer la visualisation des auréoles, la colorant Sudan IV a été ajoutée à l'huile minérale.

### 5.2.1.3 Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production des rhamnolipides

Suite à l'obtention d'une méthodologie permettant donc de sélectionner des bactéries affectées dans la production de rhamnolipides, j'ai procédé à un criblage d'environ 5000 colonies,

permettant d'isoler des transposants affectés dans la production des rhamnolipides. Ainsi, le criblage a été fait sur le milieu de culture gélosé NB+4% glycérol contenant 15 µg/ml tétracycline. À la suite de la décongélation des aliquots stockés à -80°C, 100 µl de la suspension ont été étalés sur des plaques de polystyrène de 24.5 cm x 24.5 cm contenant 200 ml du milieu et incubé pendant 72 heures à 34°C. À la suite de la croissance des colonies, une fine brume d'huile minérale colorée avec Sudan IV a été appliquée sur les géloses. Ainsi 212 candidats intéressants ont été sélectionnés (Figure 5.3).



**Figure 5.3 Criblage des transposants affectés dans la production des rhamnolipides.**

#### **5.2.1.4 Test de défauts de croissance**

Après la sélection de candidats intéressants, des courbes de croissance ont été effectuées afin de déterminer si les bactéries avaient des défauts de croissance, ce qui pourrait nuire aux analyses ou fausser l'interprétation des résultats. Les courbes de croissance ont été effectuées avec l'appareil BioScreen (OY Growth Curves AB, Ltd, Helsinki, Finlande), qui permet incubation, agitation et suivi de la croissance par spectrophotométrie. La croissance dans le milieu NB + 4% glycérol a été suivi pendant 24 heures à 34°C. Un prélèvement de la croissance cellulaire par densité optique (DO) (mode balayage, 420-580 nm) a été pris à chaque 15 minutes pour toutes les cultures. L'inoculation des cultures a été faite à partir de précultures de 16 heures.

### 5.2.1.5 Analyse de production des rhamnolipides par CL/SM

Ensuite, afin de vérifier la production variée des rhamnolipides par les transposants sélectionnés, les cultures dans le milieu NB + 4% glycérol ont été effectuées à 34 °C pendant 72 heures. La quantification des rhamnolipides produits par chacun des candidats a été effectuée en utilisant la CL/SM. La production des rhamnolipides a été rapportée en pourcentage par rapport de la production volumétrique de la souche sauvage (Figure 5.4).

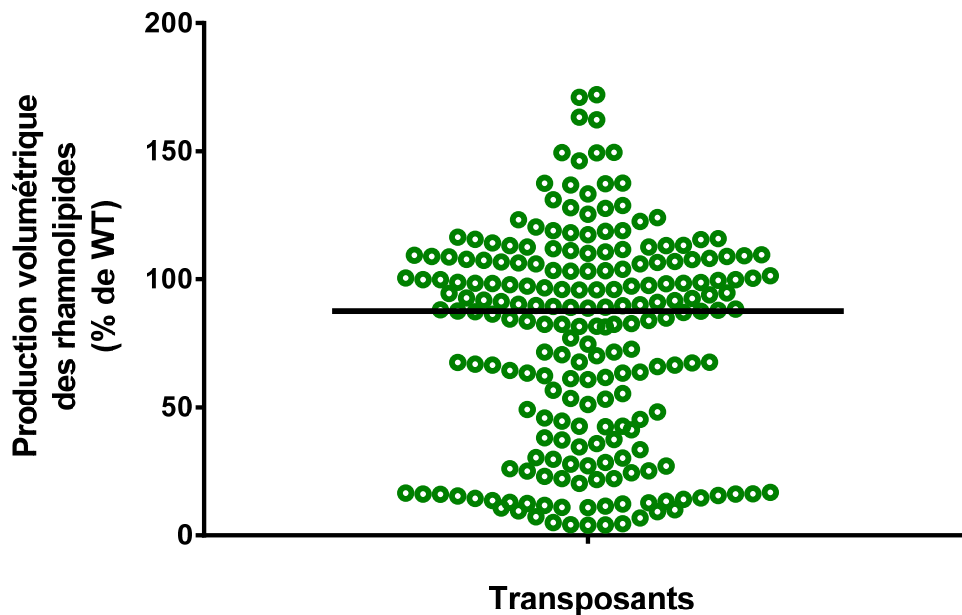


Figure 5.4 La production des rhamnolipides par les transposant sélectionnés.

Ensuite, 37 transposants ont été sélectionnés en fonction d'une production soit moins de 15% ou plus de 140% que la souche sauvage.

### 5.2.1.6 L'identification du site d'insertion du transposon dans le chromosome par amplification PCR double

Suite à l'isolement de transposants considérés intéressants selon le critère de sélection, les sites d'insertion du transposon ont été identifiés afin de connaître le gène affecté, selon la méthode de PCR semi-aléatoire nichée en deux rondes (Jacobs *et al.*, 2003). Le protocole suivi était celle décrit par Tremblay (2007).

Une fois les deux rondes de réactions PCR effectuées, celles-ci étaient vérifiées sur gel d'agarose afin de confirmer la présence de produits PCR et d'évaluer la longueur relative des fragments générés. La Figure 5.5 illustre un gel coloré au bromure d'éthidium contenant des produits PCR typiques de la réaction décrite.

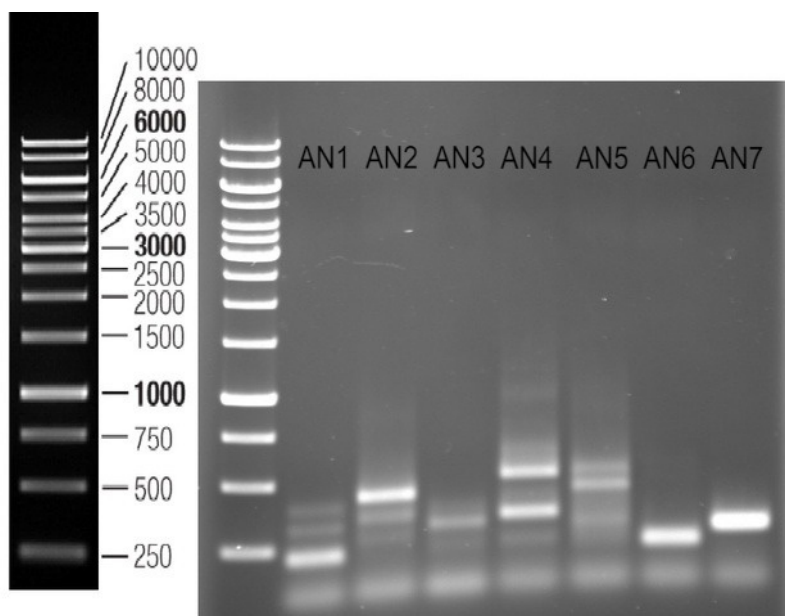


Figure 5.5 Exemple de produits PCR obtenus par la réaction PCR arbitraires en deux rondes.

Ces produits PCR ont un poids de moins de 1 kpb et contiennent plusieurs fragments de différentes longueurs. Ceci est dû au fait que la première ronde de la réaction s'est effectuée à l'aide d'une amorce spécifique au transposon et avec trois amorces arbitraires différentes. Ces amorces peuvent se lier à peu près à n'importe quel endroit sur le génome. Cela a comme conséquence que la plupart des produits amplifiés sont le produit d'une amorce spécifique et d'une des trois amorces arbitraires, ce qui résulte en des fragments d'ADN de différentes longueurs (Tremblay, 2007) .

Suite à l'amplification, les résultats des PCR ont été envoyés à l'Institut De Recherches Cliniques De Montréal (l'IRCM) pour le séquençage, en utilisant une amorce spécifique au transposon et interne à l'amorce de la deuxième ronde de PCR. Le logiciel « *Geneious* » a été employé pour lire les séquences obtenues (Kearse et al., 2012). Pour chacune des séquences analysées, il y avait environ 120 nucléotides représentant l'extrémité du transposon, suivi d'une longueur variable de nucléotides correspondant à la séquence génomique amplifiée directement adjacente au site d'insertion du transposon (Tremblay, 2007). Ces séquences ont tous été

comparées au génome entier de la souche BGR1 à l'aide de la fonction BLASTN disponible sur le site [www.burkholderia.com](http://www.burkholderia.com) (Winsor *et al.*, 2008).

Cependant, à cause des problèmes du séquençage, sur un total de 37 transposants sélectionnés, nous n'avons pas identifié que le site d'insertion de transposon pour 20 transposants. Toutefois, la moitié des gènes ont une fonction putative suggérée. Aussi, trois transposants avaient une insertion dans une région intergénique. Enfin, certains gènes sont annotés avec une littérature associée. Le Tableau 5.1 illustrent la caractéristique des transposants impliqués dans la production des rhamnolipides.

**Tableau 5.1 Caractéristiques des transposants affectés dans la production des rhamnolipides.**  
Données prises sur [www.burkholderi.com](http://www.burkholderi.com).

Transposants	Fonction de gène	Gène	Catégorie
AN1	phosphate regulon sensor kinase PhoR	bglu_1g34040	Des mécanismes de transduction de signal
AN2	DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE and related proteins	bglu_1g08130	La division cellulaire, la séparation des chromosomes
AN4	hypothetical protein	bglu_1g27430	Protéine hypothétique
AN5	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems, permease components	bglu_1g18660	Le transport et le métabolisme des glucides
AN7	protein secretion by the type II secretion system	bglu_1g06800	La motilité cellulaire et la sécrétion / trafic intracellulaire et la sécrétion
AN9	Amino acid transporters	bglu_1g08660	Le transport des acides aminés et le métabolisme
AN10	Phage-related protein	bglu_1g01240	
AN11	DNA gyrase, B subunit/hypothetical protein	bglu_1g00030	Réplication de l'ADN, la recombinaison et la réparation
AN12	Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes	bglu_1g25430	Cell envelope biogenesis, outer membrane
AN13	TrfA family protein	bglu_1p0030	
AN15	exodeoxyribonuclease III	bglu_1g24960	Réplication de l'ADN, la recombinaison et la réparation
AN17	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN20	Aldehyde dehydrogenase family protein/HTH-type transcriptional regulator eutR	bglu_1g00950	La production et la conversion de l'énergie
AN21	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN22	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN27	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN30	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN31	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN34	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique
AN35	hypothetical protein	bglu_4p0630	Protéine hypothétique